**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desenvolvimento de estratégias para incorporação de fungos
entomopatogênicos no manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908
(Hemiptera: Liviidae) na cultura dos citros**

John Jairo Saldarriaga Ausique

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2014**

John Jairo Saldarriaga Ausique
Engenheiro Agrônomo

Desenvolvimento de estratégias para incorporação de fungos entomopatogênicos no manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) na cultura dos citros

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JUNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Saldarriaga Ausique, John Jairo

Desenvolvimento de estratégias para incorporação de fungos entomopatogênicos no manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) na cultura dos citros / John Jairo Saldarriaga Ausique.- - Piracicaba, 2014.

77 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Controle microbiano 2. Greening 3. Huanglongbing 4. Manejo de pragas 5. *Beauveria bassiana* 6. *Isaria fumosorosea* I. Título

CDD 634.3
S162d

**A Deus,
Agradeço**

A cada uma das pessoas que lerem este trabalho de pesquisa

DEDICO

Como contribuição para a evolução de uma agricultura sustentável

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Brasil, por ser um país maravilhoso, suas pessoas, sua cultura, sua comida e seus costumes apaixonantes.

Ao professor Dr. Italo Delalibera Junior, pelo incentivo e oportunidade na realização deste projeto, pela sua dedicação e ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da Esalq/USP pelos ensinamentos.

Ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (CAPES Pec-PG) pelo apoio financeiro.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) pelo apoio financeiro e colaboração técnica dos seus profissionais.

A Empresa Citrosuco, pelo seu apoio multidisciplinar e profissional, pelos inúmeros recursos técnicos, logísticos, administrativos e humanos que permitiram a montagem, acompanhamento e avaliação dos experimentos realizados nas suas fazendas durante os dezenove meses de pesquisa.

Ao Engenheiro Agrônomo Pedro Baccarin, pelo excelente apoio profissional, pela amizade e por estar sempre disposto a contribuir com ideias, trabalho e conselhos durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia (Esalq/USP)

A equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (Esalq/USP), pelo apoio e convivência.

Ao professor Dr. José Roberto Postali Parra e sua excelente equipe de trabalho do Laboratório de Biologia de Insetos (Esalq/USP), pela sua valiosíssima colaboração em todas as fases de desenvolvimento da pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da Esalq/USP pela sua fundamental colaboração e sua atitude sempre prestativa.

Aos Professores e Pós-graduandos da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa e na realização das análises.

A Daiane Heloise Nunes, por me ensinar que bons amigos são difíceis de encontrar, mais ainda de deixar e impossíveis de esquecer.

A Viviane Santos pela amizade, colaboração e apoio nas longas jornadas de trabalho.

A Dona Ema Klefenz e ao Seu Luiz Rocha, sem seu carinho e apoio incondicional não teria sido possível esta conquista.

A Angela Borghesi de Camargo meu sincero muito obrigado, por ser um pilar e ponto de equilíbrio na minha vida.

A muito querida e estimada família: José Luiz dos Santos, Lourdes da Silva Santos, Roger Danilo dos Santos, Alan Carlos dos Santos, Gabriel Otavio dos Santos, Paulo Costa, Judite Costa, Ariane Costa, Aline Costa, Élide Costa, Sebastiao Natal de Lima, Claudia de Lima, Thaina Daniela de Lima, Lucas Lima, Vera Lucia da Silva e Benedito Valerio da Silva por cada momento de felicidade que recebi de vocês.

Aos meus amigos Fatima Scarpatti, Marisa Barros Crystal, Ana Paula Francisco e Luan Centoni pela amizade e todos os momentos felizes juntos.

A Solineide Gonçalves da Silva, Ernesta Souza Mendoça, Jorge Vinicius e Filipe Gonçalves pelo apoio nos momentos difíceis e por me fazer parte da família.

“A ti buen hombre de vid,
de la vida,
ten en ti la fuerza
del servicio a tu servicio.”

SAO

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão bibliográfica.....	17
2.1.1 Cultura dos citros.....	17
2.1.2 <i>Diaphorina citri</i> Kumaya (1908) (Hemiptera: Liviidae).....	17
2.1.3 Huanglongbing (HLB).....	18
2.1.4 Controle de insetos na cultura dos citros.....	19
2.1.4.1 Controle químico de <i>D. citri</i>	19
2.1.4.2 Controle microbiano de <i>D. citri</i>	19
2.1.5 Modo de ação dos Fungos entomopatogênicos.....	20
2.1.6 Produção de fungos entomopatogênicos em larga escala.....	21
2.1.7 Formulações de fungos entomopatogênicos.....	22
2.1.8 Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com pesticidas químicos.....	23
2.1.9 Testes de campo com fungos entomopatogênicos.....	23
2.2 Material e métodos.....	25
2.2.1 Origem dos insetos.....	25
2.2.2 Os fungos entomopatogênicos <i>B. bassiana</i> e <i>I. fumosorosea</i>	25
2.2.3 Produção dos fungos entomopatogênicos por fermentação sólida.....	26
2.2.4 Determinação da concentração e viabilidade dos conídios.....	28
2.2.5 Seleção de adjuvantes para aplicação com os fungos entomopatogênicos.....	29
2.2.5.1 Eficiência dos fungos formulados com seis adjuvantes.....	29
2.2.5.2 Determinação da concentração de conídios e dos adjuvantes.....	29
2.2.6 Eficiência dos fungos em laboratório.....	30
2.2.7 Eficiência dos fungos em semi-campo.....	31
2.2.8 Eficiência dos fungos em pomares de produção comercial de laranja.....	32
2.2.9 Compatibilidade dos fungos com os produtos fitossanitários mais utilizados na cultura dos citros.....	33
2.2.9.1 Avaliação <i>in vitro</i>	36
2.2.9.1.1 Efeitos dos agroquímicos no crescimento e esporulação das colônias de fungos.....	36
2.2.9.1.2 Efeitos dos agroquímicos na viabilidade de conídios.....	36
2.2.9.2 Avaliação <i>in vivo</i>	37

2.2.9.2.1 Efeitos dos agroquímicos na mortalidade causada pelos fungos nos insetos e na esporulação dos cadáveres.....	37
2.2.9.3 Análises estatísticas.....	38
2.3 Resultados e discussão.....	41
2.3.1 Seleção de adjuvantes para aplicação com os fungos entomopatogênicos.....	41
2.3.1.1 Eficiência dos fungos com seis adjuvantes.....	41
2.3.1.2 Determinação da concentração de conídios e dos adjuvantes.....	41
2.3.2 Eficiência dos fungos em laboratório.....	43
2.3.3 Eficiência dos fungos em semi-campo.....	46
2.3.4 Eficiência dos fungos em pomares de produção comercial de laranja.....	47
2.3.5 Compatibilidade dos fungos com os produtos fitossanitários mais utilizados na cultura dos citros.....	55
3 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	77

RESUMO

Desenvolvimento de estratégias para incorporação de fungos entomopatogênicos no manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) na cultura dos citros

O principal problema fitossanitário da citricultura atualmente é a doença conhecida como greening ou Huanglongbing (HLB), transmitida pelo inseto vetor *Diaphorina citri*. O presente trabalho objetivou desenvolver estratégias para incorporação dos fungos *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63, registrado para o controle de outras pragas e/ou *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em desenvolvimento como biopesticida especialmente para o manejo de *D. citri*, determinando a melhor concentração de adjuvantes e de conídios dos fungos a serem utilizados, sua eficácia em laboratório, semi-campo e campo; assim como sua compatibilidade com os agroquímicos utilizados na cultura. Na comparação dos dois fungos aplicados com seis adjuvantes no controle de *D. citri* revelaram que exceto Tween 80 a 0,001%, todos os outros adjuvantes contribuíram para aumentar a eficácia dos fungos. Os níveis de controle obtidos nos bioensaios em laboratório com *B. bassiana* e *I. fumosorosea* foram confirmados nos bioensaios em semi-campo e em campo. Realizaram-se 12 pulverizações com os dois fungos durante o período de dezembro de 2011 a janeiro de 2013 em campo nas concentrações de $2,5 \times 10^6$ conídios/mL em 2000 L/ha e 5×10^6 conídios/mL em 1000 L/ha ambos com 0,075% do adjuvante KBRAdj. Na comparação mês a mês, somente em janeiro de 2012 o controle químico foi superior a todos os outros tratamentos. No restante dos meses, as mortalidades causadas pelos tratamentos com fungos foram semelhantes entre si e semelhantes ao controle químico. As mortalidades de adultos de *D. citri* pelos fungos variaram de $96,4 \pm 3,8\%$ (dezembro/2011) a $57,8 \pm 3,5\%$ (outubro/2012). Os efeitos de 27 agroquímicos sobre o crescimento vegetativo e esporulação das colônias e a viabilidade dos conídios *in vitro* e a virulência dos fungos *in vivo* após mistura com cada um dos produtos foram determinados e revelaram que exceto os fungicidas a maioria dos produtos são compatíveis com os fungos e podem ser misturados na calda de aplicação. Estes resultados indicam que *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 e *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 são promissores para utilização no controle de *D. citri* em programas de manejo integrado de pragas de citros.

Palavras-chave: Controle microbiano; Greening; Huanglongbing; Manejo de pragas; *Beauveria bassiana*; *Isaria fumosorosea*

ABSTRACT

Development of strategies for the incorporation of entomopathogenic fungi in the management of *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) in the citrus crops

The main cause of the crop loss in citrus is currently the disease known as greening or Huanglongbing (HLB), transmitted by the insect vector *Diaphorina citri*. This study aimed to develop strategies for incorporating the fungi *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63, registered for the control of other pests and *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 in development as biopesticide especially for the management of *D. citri* by determining the optimal concentration of adjuvants and of conidia to be used, their effectiveness in laboratory, semi-field and field; as well as its compatibility with agrochemicals used in the crop. The comparison of the two fungi applied with six adjuvants for the control of *D. citri* revealed that except Tween 80 (0.001%), all other adjuvants contributed to increase the effectiveness of the fungi. Control levels obtained in the laboratory bioassays with *B. bassiana* and *I. fumosorosea* were confirmed in bioassays in semi-field and field. Both fungi were sprayed 12 times from December 2011 to January 2013 in the field at concentrations of 2.5×10^6 conidia/mL in 2000 L/ha and 5×10^6 conidia/mL in 1000 L/ha both with 0.075% of KBRAdj adjuvant. Only in January 2012 the chemical control was superior to all other treatments. In the remaining months, the mortalities caused by all the fungi treatments were similar to each other and similar to chemical control. The mortalities of adult *D. citri* by fungi ranged from $96.4 \pm 3.8\%$ (December/2011) to $57.8 \pm 3.5\%$ (October/2012). The effects of 27 agrochemicals on the vegetative growth and sporulation of colonies and conidia viability *in vitro* and *in vivo* virulence of the fungus after mixing it with each of the products were determined and showed that except the fungicides, the majority of products are compatible with the fungi and may be tank mixed. These results indicate that *B. bassiana* ESALQ-PL63 and *I. fumosorosea* ESALQ-1296 are promising for use in the control of *D. citri* in integrated pest management programs of citrus.

Keywords: Microbial control; Greening; Huanglongbing; Pest management; *Beauveria bassiana*; *Isaria fumosorosea*

1 INTRODUÇÃO

O Brasil participa com mais de 50% da produção de suco de laranja e contribui com 85% das exportações do produto ao mundo. Na safra de 2009-2010 em São Paulo e Triângulo Mineiro, a principal região citrícola do país, 317 milhões de caixas de laranja foram produzidas (CITRUSBR, 2010). Segundo o FNP (2013), só o estado de São Paulo contribuiu com 80% da produção de laranja *in natura* e seus principais destinos de exportação são Europa e Estados Unidos.

Atualmente, o principal problema da citricultura é a doença conhecida como greening ou Huanglongbing (HLB) que em 2011 encontrava-se presente em 53,3% dos talhões no estado de São Paulo, com 3,8% das plantas atacadas (CITRUSBR, 2010; FUNDECITRUS, 2011). O HLB é causado pelas bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus* (COLETE-FILHO, 2004), doença sem medidas curativas e de rápida dispersão entre as regiões produtoras (GOTTWALD, 2010). Esta bactéria é transmitida de uma planta para outra na cultura dos citros pelo inseto vetor "*Diaphorina citri*" durante a alimentação. Por isto, a utilização de mudas certificadas (sadias), a erradicação de plantas sintomáticas e o controle do inseto vetor de transmissão com inseticidas, têm sido as ferramentas utilizadas dentro do manejo agrônomo.

Uma das alternativas para o controle desta praga, são os fungos pertencentes à ordem Hypocreales (HIBBETT et al., 2007; HUMBER, 2008) por desempenharem um papel importante na supressão de insetos, muitas vezes através de epizootias (INGLIS et al., 2001). Numerosos micoinseticidas têm sido desenvolvidos com base nesses fungos, particularmente com as espécies *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (COPPING, 2009).

Por se tratarem de organismos vivos, a produção dos entomopatogênicos envolve uma matriz altamente complexa de fatores biológicos e desafios técnicos. A literatura sobre estes fungos como agentes de controle biológico é vasta e muitos manuais e artigos têm sido escritos sobre o assunto (BURGES, 1998; FERRON et al., 1991; HALL; MENN 1999; LACEY et al., 1996; LISANSKY; HALL, 1983; McCOY et al., 1988), mas na maioria dessas publicações, no entanto, faltam critérios de seleção de isolados, descrição do processo de produção e encontram-se poucas referências da eficácia do controle de pragas em condições de campo.

Estes parâmetros tem que ser avaliados detalhadamente, permitindo a integração destes entomopatógenos nos métodos de controle de pragas. Assim, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de estratégias para incorporação dos fungos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I.*

*fumoso*rosea ESALQ-1296 no manejo de *D. citri* na citricultura, determinando a melhor concentração de adjuvantes e dos fungos a ser utilizado, sua eficácia em laboratório, semi-campo e campo; assim como, sua compatibilidade com os agroquímicos utilizados na cultura.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Cultura dos citros

Em 2010 no Brasil, já eram quase 165 milhões de árvores em fase de produção e no ano anterior (2009), as exportações do complexo citros somaram 2,9 milhões de toneladas, sendo 1,129 milhão de toneladas de suco concentrado, 939 mil toneladas de suco não concentrado e 851 mil toneladas de subprodutos (FACULDADE DE ECONOMIA E ADMINISTRAÇÃO - FEA/USP, 2010). Estas vendas no exterior trouxeram de US\$ 1,5 a 2,5 bilhões por ano ao país. Praticamente, nos últimos 50 anos, a cadeia produtiva rendeu ao Brasil US\$ 60 bilhões pelo consumo mundial de suco de laranja.

Mas a cultura apresenta grandes desafios, já que as pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores na última década (FEA/USP, 2010). Neste mesmo período, a mortalidade de plantas saltou de 4% para preocupantes 7,5%. As diferentes doenças que atingem a cultura foram responsáveis por perdas de quase 80 milhões de caixas/ano e uma das preocupações mais sérias do setor é o HLB ou greening, que avança com extrema rapidez.

2.1.2 *Diaphorina citri* Kumaya (1908) (Hemiptera: Liviidae)

Costa Lima (1942), relatou pela primeira vez o inseto *Diaphorina citri* da família Liviidae no Brasil, responsável pela transmissão das bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus* associadas ao HLB ou Greening, doença relatada inicialmente em 2004 no município de Araraquara/SP (COLETTE-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). *D. citri* se alimenta de todas as variedades cítricas e plantas ornamentais como a Murta (*Murraya paniculata*), principalmente nas folhas e ramos verdes das brotações, suga as folhas novas causando enrolamento, engruvinhamento das brotações e morte da gema apical (FUNDECITRUS, 2009).

Por ser vetor deste gênero de bactérias, *D. citri* é considerado a praga que causa maior prejuízo à citricultura mundial; estando amplamente disseminado em regiões como Ásia, Oriente Médio, América do Sul, América Central, América do Norte entre outras (ABDULLAH et al., 2009; HALBERT; NUÑEZ, 2004; CERMELIN et al., 2000; REGMI; LAMA, 1988; WOOLER et al., 1974; COSTA LIMA, 1942).

A bactéria apresenta persistência não propagativa (Se reproduz dentro do inseto, mas não se transmite às outras gerações), sua transmissão ocorre só pelo processo de alimentação quando o inseto passa de uma árvore para outra e não se dissemina pelas sementes ou por

meio do vento, da água, pelos trabalhadores ou pela utilização de instrumentos agrícolas (GARAY et al., 2009).

As fêmeas de *D. citri* ovipõem cerca de 800 ovos de coloração amarela alaranjada nos tecidos vegetais novos (Brotasções) numa temperatura de 28 ± 1 °C, umidade 75-80% e 13 h fotofase. Após a eclosão, as ninfas passam por cinco ínstaes que se agregam nos ramos jovens e se alimentam da seiva, liberando o honeydew (Solução açucarada) que permite o desenvolvimento de fungos oportunistas como a fumagina (*Capnodium* sp.) que reduz a taxa fotossintética e a produtividade da planta (TSAI; LIU, 2000).

Quando o adulto emerge, se posiciona na parte abaxial das folhas e quando completa a maturidade sexual se dispersa voando. Seu ciclo de vida varia de 15 a 47 dias, dependendo das condições climáticas e as maiores densidades populacionais ocorrem no período primavera-verão, que coincide com a época de maior fluxo vegetativo das plantas cítricas (BERGMANN et al., 1994; YAMAMOTO et al., 2001; UEHARA-CARMO et al., 2006; BELOTI et al., 2007)

2.1.3 Huanglongbing (HLB)

O HLB por reduzir de forma direta a capacidade produtiva das plantas de citros, é considerado a principal doença da cultura nas diferentes regiões produtivas (BOVE, 2006). HALBERT; MANJUNATH (2004) estimaram que aproximadamente 100 milhões de árvores já estavam infectados por esta doença em 40 países. O agente etiológico causador da HLB é uma bactéria gram-negativa pertencente às Proteobacterias (GARNIER et al., 1984) e três agentes patogênicos são conhecidos, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* e *Ca. L. americanus* (JAGOEIX et al., 1994).

Os sintomas típicos da doença HLB, são folhas manchadas com amarelecimento típico na parte aérea da planta que se assemelham à deficiência de Zinco. Quando infetada a planta mostra um crescimento aberto e à medida que a doença avança, produz desfolhação seguida de uma brotação irregular, florescimento fora de época, queda de frutos e morte dos ramos. Já no interior dos frutos, se evidenciam diferentes fases de amadurecimento, desvio do eixo e em alguns casos apresenta espessura maior da parte branca da casca; além disso, as sementes são de tamanho pequeno, deformadas e abortadas (GARAY et al., 2009).

Em geral a bactéria induz a morte da planta em até quatro anos, reduz o peso dos frutos, diminui o grau Brix (Parâmetro de medição de qualidade para a indústria), aumenta do nível de acidez, diminui a porcentagem do suco e altera sua cor; quando infetada, uma planta jovem

não consegue produzir frutos e afeta a todas as variedades de plantas cítricas independente do tipo de enxerto (GARAY et al., 2009).

2.1.4 Controle de insetos na cultura dos citros

Na cultura dos citros, o controle das pragas tem sido realizado quase exclusivamente pela utilização de pesticidas químicos. No entanto, muitos países têm buscado implantar técnicas de manejo integrado utilizando medidas alternativas de controle, entre elas destaca-se o controle biológico realizado por parasitoide, predadores e por fungos entomopatogênicos.

2.1.4.1 Controle químico de *D. citri*

O monitoramento de adultos e ninfas de *D. citri*, é a base para a programação das aplicações de inseticida na cultura, principalmente entre o final do outono e o verão, épocas com maiores quantidades de brotações vegetativas. Para o controle deste inseto encontram-se disponíveis inseticidas químicos, entre eles, inseticidas sistêmicos (recomendados para aplicação em mudas na fase de formação) e inseticidas de contato de ação rápida e com período residual menor (recomendados para utilização em pomares em formação e produção) (FUNDECITRUS, 2014).

Os pesticidas sistêmicos apresentam maior eficiência quando comparados com outros métodos, principalmente para pragas sugadoras de seiva (BRANDIMARTE, 2011). A eficácia desses produtos é maior devido seu longo período residual, enquanto os de contato promovem proteção por período curto de tempo (GRAFTON-CARDWELL et al., 2013).

O nível populacional da praga, o período residual e a seletividade do produto aplicado são parâmetros importantes para determinar a frequência de aplicação e o impacto desses produtos sobre populações de inimigos naturais, como parasitóides, predadores e entomopatógenos (GRAFTON-CARDWELL et al., 2013; QURESHI; STANSLY, 2010).

2.1.4.2 Controle microbiano de *D. citri*

O potencial de vários isolados de fungos foi revelado para diversas pragas, mas poucos têm sido usados comercialmente como biopesticidas (FERRÔNIO, 1985). É primordial o desenvolvimento de micoinseticidas eficazes no controle de pragas a fim de inseri-los no sistema de manejo integrado de pragas e sua rotação com inseticidas químicos, reduzindo os impactos sobre os inimigos naturais. No Brasil, os estudos da potencialidade dos entomopatógenos sobre *D. citri* são reduzidos.

Os fungos *Metarhizium anisopliae*, *B. bassiana* e *I. fumosorosea* mostraram ação micoinseticida sobre *D. citri*, apresentando mortalidades entre 22% e 50% para os estágios imaturos e de 30% a 60% para os adultos (LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2012). Outro estudo determinou que a concentração letal média (CL₅₀) do fungo *I. fumosorosea* para adultos de *D. citri* é 6.8×10^5 conídios/mL (HOY et al., 2010), com este patógeno se conseguem níveis de mortalidade de acima de 80% nos oito dias após o inseto ter sido pulverizado com o fungo (AVERY et al., 2011).

2.1.5 Modo de ação dos fungos entomopatogênicos

Após o inseto entrar em contato com o conídio, este se adere à superfície da cutícula e germina. A germinação é influenciada diretamente pela disponibilidade de nutrientes, oxigênio, água, pH e temperatura. Os conídios penetram a cutícula pela ação degradativa de enzimas e pela pressão exercida na mesma pelo tubo germinativo e apressório (FERRÔNIO, 1985; STARNES et al., 1993). Em geral, fungos com uma gama de hospedeiros restrita têm exigências mais específicas para a sua germinação (St. LEGER, 1989a).

Os fungos entomopatogênicos invadem o inseto por penetração direta da cutícula, a qual tem duas camadas (A epicutícula exterior e procutícula). A epicutícula é uma estrutura fina e muito complexa, carece de quitina, contém proteínas de fenol estáveis e esta coberta por uma camada de cera, contendo ácidos de gordura, lipídios e esteróis (HACKMANN, 1984). A procutícula constitui a maior parte da cutícula e contém fibras de quitina incorporadas numa matriz de proteína, juntamente com os lipídios e quinonas (NEVILLE, 1984). A proteína pode constituir até 70% da cutícula e em algumas áreas está organizada de forma helicoidal dando origem a uma estrutura laminada.

Uma variedade de enzimas extracelulares que podem degradar os componentes principais da cutícula dos insetos (Quitinases, lipases, esterases e pelo menos quatro diferentes classes de proteases), parecem atuar na patogênese dos fungos. Além disso, sintomas comportamentais, como paralisia parcial ou geral, lentidão e diminuição da irritabilidade em insetos infectados pelo fungo são consistentes com a ação de toxinas neuromusculares (ROBERTS, 1981).

Após a penetração, o fungo se espalha pela hemocele (FLEXNER et al., 1986) e produz quantidades significativas de compostos tóxicos dentro de seu hospedeiro causando paralisia e morte nos insetos. Sendo que beauvericina, beauverolides, bassianolide e isarolides foram isolados de hospedeiros infectados por *B. bassiana* (HAMILL, 1969; ELSWORTH, 1977) e destruxin e Citocalasin foram isolados a partir de hospedeiros infectados por *M. anisopliae*

(BRADFISCH, 1990). Depois disso, o fungo coloniza o corpo totalmente e esporula na sua superfície, podendo subsequentemente infectar outros hospedeiros susceptíveis (WHITTEN; OAKESHOTT, 1991).

A fim de evitar a invasão por fungos, insetos desenvolveram vários mecanismos de defesa. O arsenal defensivo do inseto contém barreiras passivas estruturais (A cutícula) e uma cascata de respostas ativas para os patógenos que chegam a hemocele (Melanização, reações celulares e humorais para reconhecer o patógeno e a produção de inibidores de protease) (MELLO, 1999).

2.1.6 Produção de fungos entomopatogênicos em larga escala

Para o desenvolvimento de um produto baseado em fungos entomopatogênicos, o primeiro passo é a coleta de diferentes isolados de fungos e a triagem em laboratório que permita avaliar a patogenicidade, efetividade e virulência em diferentes insetos pragas (JENKIN et al., 1998) Para bioensaios de seleção de isolados, uma produção inicial em placas de Petri contendo meio artificial sólido geralmente é o suficiente.

Após um ou mais isolados serem selecionados, maiores quantidades de conídios de fungo são necessárias, tornando necessário determinar a viabilidade de sua produção em larga escala. Isto requer o desenvolvimento de um sistema de produção que não apenas produza conídios em quantidades suficientes para uso experimental, mas que apresente uma qualidade uniforme, compatíveis com a formulação e com o equipamento de aplicação selecionado. Por tal motivo, um rigoroso procedimento de controle de qualidade deve ser estruturado, permitindo manter níveis baixos de contaminação (JENKIN et al., 1998).

Os produtos microbianos a base de fungos entomopatogênicos foram desenvolvidos a partir de um grupo seletivo de Hypocreales, particularmente sobre fungos dos gêneros *Aschersonia*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* (Paecilomyces) e *Lecanicillium* (Verticillium). Dentre eles, os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são os mais utilizados, ambos têm uma ampla gama de hospedeiros e são relativamente fáceis de produzir. Uma extensa revisão foi feita por Feng et al. (1994) sobre a produção, formulação e aplicação de *B. bassiana*. Este fungo é produzido em larga escala em muitos países por fermentação em estado sólido, fermentação em estado líquido e fermentação bifásica (FERRÔNIO, 1981; BARTLETT; JARONSKI, 1988; BRADLEY et al., 1992; FENG et al., 1994). Já *M. anisopliae* é normalmente produzido por fermentação sólida (MENDONÇA, 1992; MILNER; HUNTER, 2001).

Cada organismo precisa de um meio ou substrato de crescimento adaptado às suas exigências nutricionais, mas também a escolha dos equipamentos para produção são fatores que influenciaram no custo final do produto e na estabilidade e qualidade do produto final.

2.1.7 Formulações de fungos entomopatogênicos

O desenvolvimento de um produto estável, capaz de controlar as pragas de forma eficaz, requer uma boa formulação. O principal objetivo da formulação é a de estabilizar e proteger os propágulos no armazenamento e após a aplicação. A formulação precisa ser fisicamente estável, ou seja, sem aglomeração ou sedimentação irreversível de propágulos, nem a separação dos transportadores em caso de emulsões, além de proteger o ingrediente ativo (O fungo) da degradação, a formulação também deve inibir o crescimento de possíveis contaminantes (Microrganismos indesejados) que diminuam a viabilidade do bioproduto durante seu armazenamento (COUCH; IGNOFFO, 1981; RHODES, 1990; GUILLON, 1993; HOFSTEIN; FRIDLENDER, 1994; JONES et al., 1997; JONES; BURGESS, 1997; COUCH, 2000; BOYETCHKO et al., 1999; BRAR et al., 2006; JACKSON et al., 2010).

A formulação de fungos entomopatogênicos é um grande desafio, já que há necessidade da adesão do conídio a parte externa do inseto e penetração através da cutícula. Este processo de infecção é descrita em detalhes por Butt (2002). A infecção é um processo complicado em comparação com as bactérias e com os baculovírus (via oral), ou em comparação com o comportamento de busca ativa e penetração dos nematoides dentro do processo de infecção.

Os micopesticidas são baseados em conídios aéreos, alguns em conídios e hifas em substrato granular, e alguns em blastosporos (DE FARIA; WRAIGHT, 2007). A maioria dos fungos produzem grandes quantidades de conídios aéreos de paredes espessas e relativamente estáveis, que são responsáveis pela dispersão e infecção (JACKSON et al., 1997).

Feng et al. (1994) revisaram as formulações de *B. bassiana* a base de conídios, blastosporos e micélio; assim como Jackson et al. (2010) revisaram as considerações ecológicas na produção e formulação de entomopatógenos fúngicos, com ênfase nas interações entre o propágulo e a cutícula do inseto, e o papel de um surfactante. Aspectos relacionados com a formulação podem ser melhorados durante a produção, como é o caso da tolerância à dessecação, através de aditivos, que melhora a sobrevivência de esporos durante a secagem e a estabilidade no armazenamento (JACKSON et al., 2006).

Formulações à base de óleo foram desenvolvidas para conídios de *M. anisopliae* var. *acridum* para controle de gafanhotos e possibilitou o uso desse fungo em ambientes quentes e secos (BATEMAN et al., 1993). Esta tecnologia de formulação tem vantagens como melhorar

a vida de prateleira, a persistência no campo, e permite uma aplicação em campo utilizando equipamentos convencionais de ultra-baixo volume (BATEMAN, 1997). Bateman e Alves (2000) sugeriram que os produtos formulados desempenham um papel maior do que a aplicação direta de gotículas no caso do controle de gafanhotos, melhorando a persistência dos esporos pela mistura, bem como o processo de adesão dos esporos nos insetos.

2.1.8 Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com pesticidas químicos

A ênfase sobre o papel dos inimigos naturais e a sensibilidade destes aos pesticidas químicos são o eixo central das abordagens do manejo integrado de pragas (HANVRO; ROSEN; ROSSLER, 1987).

Embora existam muitos estudos *in vitro* sobre a resistência/tolerância dos entomopatógenos aos diferentes pesticidas químicos utilizados em diferentes culturas, poucos são os estudos *in vivo* em condições de campo sobre os impactos em grandes áreas e no longo prazo. Este é, portanto, um obstáculo para a incorporação dos micopesticidas e a maximização do controle biológico pela ação dos fungos nos programas de MIP. Com exceção dos fungicidas acredita-se que, a maioria dos pesticidas são seletivos aos fungos entomopatogênicos e podem ser usados para controlar pragas sem afetar negativamente estes inimigos naturais importantes (POPRAWSKI; MJCHROWICZ, 1995).

2.1.9 Testes de campo com fungos entomopatogênicos

Depois de realizadas as fases de produção, formulação e bioensaios em laboratório com fungos entomopatogênicos, os testes de campo são importantes para o entendimento das condições que o produto requer para poder ser utilizado em larga escala. Além disso, testes em campo são necessários para determinar a dose e o melhor método de aplicação. Finalmente, testes de campo precisam entregar prova da eficácia do produto final para fins de registro.

Considerações para testes de campo em estufas contra pragas são fornecidos pelo Burges (2007), ilustrada por exemplos com *Bacillus thuringiensis* e *Lecanicillium longisporum*. Ele se concentrou no delineamento experimental, a infestação por pragas e métodos de pulverização. Evans (1999) descreveu os parâmetros envolvidos na aquisição da dose e considerações relevantes necessárias no campo para a determinação da eficácia dessa dose, e sobre a importância da persistência do inoculo primário e o papel do inoculo secundário.

Para avaliar o uso de entomopatógenos contra pragas, muitos métodos podem ser usados, dependendo do agente microbiano, a praga alvo, da cultura e do meio ambiente. Uma

excelente visão geral dos métodos e ferramentas para oferecer experiências com entomopatógenos é dada no “Manual de Campo de Técnicas em Patologia de Invertebrados” (LACEY; KAYA, 2007). Vários capítulos focam nas considerações de avaliação com cada um dos patógenos, enquanto outros se concentram sobre o uso de patógenos em sistemas específicos, como estufas e gramados, etc. Particularmente útil é o capítulo de Chapple et al. (2007), que discute a aplicação de microrganismos como produtos em relação à pulverização, equipamentos e dose numa cultura agrícola, mas a maioria das suas considerações são teóricas.

O desafio para o desenvolvimento de produtos é integrar num programa de testes todos os aspectos que precisam ser estudados para trazer um produto econômico, eficaz e de fácil utilização. Este programa de testes não deve demorar muito e deve ser acessível em termos de tempo e dinheiro. Isto requer uma compreensão boa da cultura, conhecer as metas e o produto microbiano que está em desenvolvimento, incluindo o sistema de entrega.

Cada caso exige uma abordagem específica e um bom entendimento das questões relevantes. Organismos com um modo de ação por via oral (Bt e baculovírus) são bem diferentes em comparação com organismos de modo de ação por contato (fungos entomopatogênicos) e demanda outra abordagem. Uma visão geral dos métodos de ensaio para entomopatógenos é dada por Koppenhöfer (2007).

Testes em plantas inteiras, ou ainda melhor em um sistema de cultura, deve provar que o isolado selecionado é também eficaz sob essas condições. Isto pode inicialmente ser feito com propágulos de culturas de laboratório, mas deve ser seguido por propágulos produzidos em massa e do produto formulado. Os equipamentos de aplicação devem ser semelhantes aos equipamentos utilizados pelo produtor em larga escala. Nestes ensaios, o volume de pulverização ideal necessária para entregar a dose da melhor maneira também deve ser estudado, e isso pode variar dependendo da cultura e como ela é cultivada.

Estabelecer a dose é crucial para a economia do produto e deve responder à pergunta: "o produto desenvolvido satisfaz as expectativas do produtor em termos de resultados e economia?". Os dados iniciais sobre a relação dose-mortalidade provenientes de bioensaios, deve ser seguido por testes de semi-campo e, finalmente, confirmado por testes em áreas extensivas com a formulação final; para determinar a aplicação ideal. Isso se refere ao método de aplicação, o momento da aplicação, a frequência e os intervalos.

Além disso, o modelo é relevante no que diz respeito ao nível da praga e da estrutura etária da população e da posição da praga na planta e folhas. Os insetos podem estar em toda a planta ou somente na parte superior de crescimento, embaixo das folhas, em flores, etc. Isso

varia por pragas e podem ser dependente da cultura. Os testes de campo irão subsidiar as recomendações do rótulo final para de registro. A fim de obter aprovação para um produto, a eficácia tem de ser comprovada com certo número de testes realizados sob condições de cultivo comercial e comparado com um produto de referência.

O número restrito de trabalhos em campo também pode estar relacionado com a dificuldade das avaliações dos experimentos, além da necessidade de um bom acompanhamento das condições atmosféricas (precipitação, temperatura média, radiação solar e umidade relativa), para que se possa visualizar a existência de correlações entre o desenvolvimento e/ou permanência do patógeno e os fatores ambientais, isolando-os, para se avaliar somente o efeito do produto químico sobre o entomopatógeno (ALVES et al., 1998).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Origem dos insetos

Nos experimentos, foram utilizados adultos *D. citri* oriundos de criação massal em casa de vegetação do Laboratório de Biologia de Insetos ESALQ/USP (Figura 1). A técnica de criação foi adaptada de Gómez-Torres (2009), sendo utilizadas plantas de *Murraya paniculata* (L.) Jack., por ser essa espécie o hospedeiro preferencial para alimentação e oviposição de *D. citri* (NAVA et al., 2007).

2.2.2 Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *I. fumosorosea*

Os isolados utilizados, *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296, provenientes da coleção de microrganismos entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP, Piracicaba/SP, Brasil (Tabela 1) foram previamente selecionados para o controle de *D. citri* em estudos conduzidos no laboratório de Patologia e Controle Microbiano (ESALQ-USP). A identificação específica dos fungos foi realizada através de caracteres morfológicos e sequenciamento gênico.

Figura 1 - Criação massal de *D. citri*. **A.** Adulto, **B.** Ninfas, **C.** Adultos localizados na parte abaxial da folha de Limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), **D.** Gaiolas utilizadas para criação em casa de vegetação sobre bancada (8x1m), **E.** Transferência de adultos para oviposição com o auxílio de tubos de vidro, **F.** Planta de *M. paniculata* contendo ninfas com presença de Honey dew, **G.** Planta de *M. paniculata* infestada por adultos, **H.** Separação dos adultos da planta dentro da gaiola (Facilita a coleta), **I.** Sugador manual utilizado para a transferência dos adultos

Tabela 1 - Origem dos isolados de fungos provenientes da coleção de microrganismos da ESALQ/USP utilizados nos experimentos

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Origem
<i>Isaria fumosorosea</i>	ESALQ-1296	<i>Bemisia tabaci</i>	Jaboticabal-SP
<i>Beauveria bassiana</i>	ESALQ-PL63	<i>Atta sp.</i>	Piracicaba-SP

2.2.3 Produção dos fungos entomopatogênicos por fermentação sólida

Os fungos foram cultivados em placas de Petri (12 cm) contendo meio sólido Sabouraud Dextrose Agar, enriquecido com 1% extrato de levedura (SDYA) (GOETTEL; INGLIS, 1997) em câmara climatizada tipo B.O.D. a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase por 7-10 dias. Os conídios produzidos em SDYA foram utilizados para a preparação das suspensões inoculadas em cada lote de produção destes entomopatógenos pelo método de fermentação sólida em arroz parboilizado cozido como substrato (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

Figura 2 - Produção de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* por fermentação sólida em arroz. **A.** *I. fumosorosea* esporulado em placa de Petri, **B.** Suspensão de conídios para inoculação, **C.** Sacolas de polipropileno contendo 250gr de arroz autoclavado (120°C - 20 min.), **D.** Incubação por 7 – 10 dias a 26 °C até esporulação do fungo em câmara climatizada tipo B.O.D. após inoculação de 10 mL de suspensão, **E.** Secagem de arroz + *B. bassiana* por 2 -3 dias a 16 °C com desumidificador em bandejas de plástico, **F.** Arroz e esporos de *I. fumosorosea* secos, **G.** Amostra para quantificação da concentração dos conídios, **H.** Separação dos conídios dos grãos de arroz em agitador de peneiras magnético, **I-J.** Conídios de *I. fumosorosea*, **K.** Determinação da viabilidade conídios em Placa de Petri “Rodac”, **L-M.** Armazenamento dos conídios em freezer -20°C

O arroz parboilizado foi deixado de molho na água por 50 minutos para sua hidratação e escorrido com peneira de malha fina; após este tempo, foram transferidas 250 gramas de arroz para sacolas de polipropileno e fechadas com grampos metálicos, sendo esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos (Figura 2 C). Após o esfriamento dos grãos, se inoculou 10 mL de uma suspensão fúngica na concentração de 1×10^8 conídios/mL em capela de fluxo laminar e homogeneizando a mistura (Arroz + fungo) manualmente. Depois, as sacolas foram transferidas para câmara climatizada tipo B.O.D. a $26^\circ\text{C} \pm 2$ e 12 horas de fotofase por um período de 7-10 dias incubação até a esporulação do fungo no substrato (Figura 2 D).

O arroz com o fungo já esporulado foi transferido para bandejas plásticas e estas mantidas por 2-3 dias em sala climatizada a 16°C para secagem com o auxílio de um desumidificador (Figura 2 E, F). A redução da umidade do arroz colonizado pelo fungo foi necessária para a extração dos conídios num agitador de peneiras magnético (Figura 2 H). O pó de conídios foi armazenado em frascos de vidro borossilicato da marca Schott com capacidade de 250 mL ou em tubos para centrifugação tipo Falcon, dentro de sacolas de polipropileno seladas a vácuo para preservação do fungo (Figura 2L, M).

2.2.4 Determinação da concentração e da viabilidade dos conídios

Para cada produção dos fungos entomopatogênicos, 0,1 g de conídios secos por lote foi transferido para tubos de vidro, adicionado 10 mL de água destilada com 0,05% de espalhante adesivo Tween 80® e vedados com Parafilm®. Os conídios foram separados por agitação mecânica em Vortex (Biomixer) por cinco minutos, seguido de submersão em água com vibração ultrassônica por 30 segundos. A concentração de conídios/mL foi determinada em câmara de Neubauer após diluição seriada da suspensão original (ALVES, 1998).

Para determinar a viabilidade dos conídios, 140 µL de uma suspensão na concentração 1×10^6 conídios/mL foi plaqueada em placas de Petri “Rodac” contendo 4 mL de meio Batata Dextrose Ágar, antibiótico veterinário a 0,5% (Pentabiótico Reforçado, Fort Dodge Saúde Animal Ltda®) e Derosal® 500 SC a 0,01% (Bayer CropScience, composição: Methyl benzimidazol-2-ylcarbamat e Tetramethylthiuram dissulfide) (Oliveira, 2009). As placas foram colocadas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 26 ± 2 °C por 18 horas e a viabilidade foi avaliada em microscópio pela porcentagem de conídios germinados e não germinados nos quatro quadrantes centrais da placa (Figura 2 K).

2.2.5. Seleção de adjuvantes para aplicação com os fungos entomopatogênicos

2.2.5.1 Eficiência dos fungos formulados com seis adjuvantes

Os isolados *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foram pulverizados na concentração de 5×10^6 conídios/mL com os adjuvantes Tween 80® a 0,01%, KBRAdj (Produto em análise para registro) a 0,075%, Silwet® L-77 a 0,025%, Break-thru® a 0,005%, Cerium plus a 0,1%, Agral a 0,05%. As concentrações dos adjuvantes foram determinadas em laboratório onde se considerou a menor dose que permitiu o maior espalhamento da gota na superfície da folha de laranja (dados não apresentados). Foi utilizado um controle com aplicação de somente água e outros controles onde cada adjuvante foi aplicado com água sem o fungo.

O experimento foi realizado em plantas de citros (*Citrus sinensis* variedade Pera) de 2 metros de altura em campo aberto no Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP). Estes estudos foram realizados em semi-campo, pois observações prévias mostraram que efeitos letais de alguns adjuvantes em laboratório não se reproduzem em campo. Em cada planta foram transferidos 20 insetos adultos de *D. citri* confinados dentro de tecido tipo “Voile”. As aplicações foram realizadas no final da tarde, através do “Voile” com auxílio de um pulverizador manual (Manual Spray gun) até o ponto de molhamento foliar, mas anterior ao ponto de escoamento; equivalente a aproximadamente 14 mL/planta, simulando uma aplicação de campo em condições de produção comercial. Um *Datalogger* (IDEL Manaus HT-4000) dentro de uma copa de uma árvore de citros na área experimental para registro da temperatura e umidade relativa.

O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições por tratamento e as avaliações da mortalidade dos insetos foram realizadas aos 3, 5, 7 e 10 dias após a aplicação. No último dia, os cadáveres foram coletados e transferidos para câmara úmida e mantidos por 72h a 26°C para confirmação da esporulação dos fungos entomopatogênicos. Os dados de mortalidade dos insetos e a esporulação nos cadáveres para cada fungo com cada adjuvante foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa SAS (Copyright © 2013 SAS Institute Inc.).

2.2.5.2 Determinação da concentração de conídios e dos adjuvantes

Este experimento objetivou determinar a melhor concentração de conídios e a possibilidade de reduzir a concentração do adjuvante Silwet L-77 devido ao alto custo deste produto. Utilizou-se 68 plantas de citros (*Citrus sinensis*, variedade Pera) de

aproximadamente dois metros, mantidas no Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP). Adultos de *D. citri* foram confinados em tecido tipo “voile” (20 insetos/cada). Suspensões de 5×10^6 conídios/mL e 1×10^7 conídios/mL de *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foram aplicadas com Silwet L-77 a 0,025% e 0,05%. O adjuvante 0,075% KBRA_{adj} foi utilizado como parâmetro de comparação sendo aplicado com 5×10^6 conídios/mL dos dois fungos. A metodologia de aplicação e avaliação foi semelhante ao experimento anterior. Os dados de mortalidade dos insetos e a esporulação nos cadáveres foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013).

2.2.6 Eficiência dos fungos em laboratório

Os bioensaios foram realizados com adultos de *D. citri* (20 insetos/repetição) em mudas de Limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) confinados em gaiolas individuais de 20 cm de altura (Figura 3). As gaiolas foram confeccionadas com copos de polietileno de 500 mL contendo tecido *voile* na parte superior para facilitar a ventilação. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada a 25 ± 2 °C, 75-90% UR e fotofase de 12 h por 10 dias após a aplicação.

As suspensões dos dois fungos entomopatogênicos foram aplicadas em laboratório na concentração de 5×10^6 conídios/mL com 0,075% KBRA_{adj}. O adjuvante a 0,075% foi também aplicado isoladamente sem os fungos e o controle consistiu da pulverização só de água. Foi incluído um tratamento com inseticida químico Dimexion (0,01 mL/100 mL). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições/tratamento e o experimento repetido quatro vezes no tempo. As aplicações fungicas foram realizadas com um pulverizador tipo “*airbrush*” num volume de 700 µL por planta (até molhamento das folhas, mas anterior ao ponto de escorrimento) por uma das aberturas lateral da gaiola. As avaliações foram realizadas diariamente por 10 dias e os insetos mortos colocados em câmara úmida por 72h a 26°C para a confirmação da infecção pela esporulação dos fungos nos cadáveres.

Os dados de mortalidade dos insetos e a esporulação nos cadáveres obtidos em cada bioensaio foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Além disso, as médias de mortalidade e esporulação dos quatro bioensaios foram analisadas simultaneamente num fatorial ANOVA pelo teste de Tukey-Kramer ($P < 0,05$), determinando a interação (Nível de significância) entre os tratamentos ao longo do tempo, utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013).

Figura 3 - Confecção das arenas utilizadas nos experimentos de eficiência dos fungos em laboratório. **A-B.** Gaiola de polipropileno, **C.** Acondicionamento das plantas ao tamanho das gaiolas, **D-E.** Distribuição das gaiolas nas badejas que permitem a absorção de água pela planta, **F.** Unidade experimental, **G.** Pulverizador tipo “airbrush”, **H.** Experimento montado em sala climatizada

2.2.7 Eficiência dos fungos em semi-campo

O experimento foi realizado em plantas de citros (*Citrus sinensis*, variedade Pera) de aproximadamente 2 metros em campo aberto no Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP). As plantas foram adquiridas em sacos plásticos e foram colocadas sobre o solo um ano e meio antes da instalação dos experimentos sendo que no momento da aplicação estavam enraizadas no solo. Para cada planta foram transferidos 20 insetos adultos de *D. citri* confinados dentro de tecido tipo “Voile”.

Neste experimento compararam-se os dois fungos, *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296, na concentração de 5×10^6 conídios/mL com 0,075% KBRAAdj usando-se 15 repetições por tratamento e o experimento repetido 3 vezes no tempo. Foi incluído um tratamento com o inseticida químico Dimexion (0,1 mL/100 mL) e uma testemunha só com pulverização de água e outra com água + adjuvante. As aplicações foram realizadas no final da tarde, através do “Voile” com auxílio de um pulverizador manual

(Manual Spray gun) até molhamento das folhas, mas anterior ao ponto de escorrimento equivalente a aproximadamente 14 mL/planta.

Em cada experimento foi utilizado um *Datalogger* (IDEL Manaus HT-4000) para registro da temperatura e umidade relativa. O delineamento foi inteiramente casualizado e as avaliações realizadas aos 3, 5, 7 e 10 dias após a aplicação, e no último dia foram coletados os insetos mortos, levados para laboratório e colocados em câmara úmida por 72h a 26°C para a confirmação da esporulação dos fungos nos cadáveres.

Os dados de mortalidade dos insetos e a esporulação nos cadáveres obtidos em cada bioensaio foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Além disso, as médias de mortalidade e esporulação dos três bioensaios foram analisadas simultaneamente num fatorial ANOVA pelo teste de Tukey-Kramer ($P < 0,05$), determinando a interação (Nível de significância) entre os tratamentos ao longo do tempo, utilizando o programa SAS (Copyright © 2013 SAS Institute Inc.)

2.2.8 Eficiência dos fungos em pomares de produção comercial de laranja

No Distrito de Rechã em Itapetininga/SP, foi avaliada a eficácia dos fungos entomopatogênicos no controle de adultos de *D. citri* ao longo do ano. Os tratamentos foram distribuídos em uma área de 16,4 ha, com 470 plantas/ha (*Citrus sinensis* L. Osbeck - Variedade Valência) de sete anos de idade, com um espaçamento de 6,8m entre ruas e 3,1m entre plantas. Foram realizadas 12 aplicações com turbo Jacto ARBUS 4000 no período de Dezembro/2011 a Janeiro/2013 (Figura 4). O experimento consistiu de oito tratamentos: *I. fumosorosea* ESALQ-1296 a $2,5 \times 10^6$ conídios/mL em 2000 L/ha, *I. fumosorosea* ESALQ-1296 a 5×10^6 conídios/mL em 1000 L/ha, *B. bassiana* ESALQ-PL63 a $2,5 \times 10^6$ conídios/mL em 2000 L/ha, *B. bassiana* ESALQ-PL63 a 5×10^6 conídios/mL em 1000 L/ha todos com 0,075% do adjuvante KBRAdj (Figura 5). No tratamento com inseticida químico foi utilizado o produto Provado 200 SC® (Imidacloprido, Bayer) a 0,40 L em 1000 L/ha em maio e agosto de 2012 e no restante dos meses com Dimexion® (Dimetoato, Cheminova) a 2 L em 1000 L/ha. Os tratamentos controles consistiram na pulverização de somente água em 1000 L/ha, água com 0,075% do KBRAdj e sem aplicação. Na pulverização de 1000 litros/ha utilizou-se Marcha 2A, 1800 RPM, 180 Psi, bico 4, difusor 23, utilização de 34 bicos. Para obtenção do volume de 2000 litros/ha alterou-se a Marcha para 2B.

Adultos de *D. citri* foram confinados em tecido tipo “voile” sendo 20 insetos/ voile, 1 voile por planta e 3 plantas por bloco, colocados em galhos de estagio vegetativo V3-V4, externamente na parte média da copa da árvore. Para cada tratamento utilizou-se três blocos

por tratamento (repetições), sendo as plantas escolhidas ao acaso. Em cada experimento, foi instalado um *Datalogger* (IDEL Manaus HT-4000) para registro da temperatura e a umidade relativa na parte interna da copa das árvores com registro dos parâmetros a cada 30 minutos. As avaliações de mortalidade de *D. citri* foram realizadas 10 dias após a aplicação e a confirmação da infecção por esporulação dos cadáveres foi realizada após incubação em câmara úmida em laboratório após 72h a 26°C (Figura 6).

Os dados de mortalidade dos insetos e a esporulação nos cadáveres de cada uma das aplicações de campo foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Além disso, as médias de mortalidade e esporulação das doze aplicações de campo foram analisadas simultaneamente num fatorial ANOVA pelo teste de Bonferroni (Dunn) ($P < 0,05$), determinando a interação (Nível de significância) entre os tratamentos ao longo do tempo, utilizando o programa SAS (Copyright © 2013 SAS Institute Inc.).

Os dados climáticos dos dez dias após a aplicação dos tratamentos (período entre a pulverização e a avaliação de mortalidade) foram obtidos a cada 30 minutos. Calcularam-se os valores médios da temperatura e umidade máxima e mínima utilizando-se os dez maiores ou menores valores por dia, respectivamente. Os valores utilizados nas análises referem-se a média dos dez dias, ou seja, de 100 valores. A precipitação acumulada nos dez dias após cada pulverização também foi calculada. Análises de regressão múltipla *stepwise* foram conduzidas sendo as variáveis independentes temperatura e umidade (máxima e mínima) e precipitação e as variáveis dependentes ou resposta mortalidade e esporulação.

2.2.9 Compatibilidade dos fungos com os produtos fitossanitários mais utilizados na cultura dos citros

Na avaliação da compatibilidade com os fungos entomopatogênicos foram escolhidos 27 produtos fitossanitários comumente utilizados na cultura dos citros (inseticida/acaricida, inseticida biológico, inseticida, acaricida, fungicida, inseticida/acaricida/fungicida, fungicida/bactericida, fertilizante foliar, espalhantes) descritos na tabela 3. Os estudos foram conduzidos em duas etapas em laboratório: a primeira etapa constituiu na avaliação *in vitro* determinando-se os efeitos dos produtos no crescimento e na esporulação das colônias em placas de Petri, assim como na germinação dos conídios, e a segunda etapa consistiu na

avaliação *in vivo* por bioensaio de patogenicidade sobre adultos de *D. citri* pulverizados com misturas do fungo e os agroquímicos onde se determinou a mortalidade dos insetos e esporulação nos cadáveres.

Figura 4 - Aplicação dos fungos *B. bassiana* e *I. fumosorosea* e do inseticida químico em condições de campo. **A.** Pulverizador acoplado num trator Massey Ferguson 275, **B.** Pulverizador Jacto – Arbus4000 VA de agitação hidráulica, **C.** Incorporador do produto á água da calda, **D.** Lavagem do reservatório de água (4000 L) e dos bicos de pulverização, **E-F.** Lavagem dos filtros (Retenção das impurezas contidas na calda), **G-H.** Inspeção do abastecimento da água e a qualidade da mistura após incorporação da formulação/Inseticida, **I.** Distribuição e marcação das plantas por tratamentos (Facilitando a operacionalidade da aplicação), **J.** Aplicação dos tratamentos, **K.** Molhamento da planta após aplicação, **L.** Sacolas de tecido tipo “Voile” contendo adultos de *D. citri*

Figura 5 - Fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *I. fumosorosea* com 0,075% do adjuvante KBRAAdj. **A.** Preparo das suspensões fúngicas. **B.** Acondicionamento do material em caixas térmicas de isopor para transporte até a área experimental. **C.** *B. bassiana* para aplicação em 1 ha de árvores de citros, **D.** Distribuição dos fungos por tratamentos, **E.** Inseticida Dimexion (1 L/ha) utilizado para o controle químico de *D. citri* no citros, **F.** *B. bassiana* vs inseticida Dimexion

Figura 6 – Avaliação do experimento e processamento das amostras. **A.** Avaliação da mortalidade dos adultos de *D. citri* (Contidos na sacola tipo “Voile”), coleta, identificação e transporte do material ao laboratório, **B-C.** Coletas dos insetos nas sacolas de tecido, **D-E.** Transferência dos adultos para placas de cultura de células de 24 poços (câmara úmida) para favorecer o desenvolvimento do micélio externo e esporulação dos fungos entomopatogênicos, **F.** Esporulação nos cadáveres de *D. citri* (Foto: D’Alessandro, 2013)

2.2.9.1 Avaliação *in vitro*

2.2.9.1.1 Efeitos dos agroquímicos no crescimento e esporulação das colônias de fungos

Inicialmente, os fungos foram cultivados em placas de Petri (12 cm) contendo meio SDAY (Sabouraud Dextrose Agar, enriquecido com 1% extrato de levedura) (GOETTEL; INGLIS, 1997) em câmara climatizada tipo B.O.D. a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase por cinco dias para utilização antes da conidiogênese (Figura 7G).

Os produtos fitossanitários utilizados nos testes *in vitro* foram filtrados para eliminar contaminantes inicialmente em papel de filtro 80g/m^2 colocado num funil de Büchner acoplado a uma bomba de vácuo Prismatec 131 ($2,2\text{ m}^3/\text{h}$, 37 lpm) e depois em filtro estéril para seringa de membrana PES de baixa retenção de volume (TPP $0,22\mu\text{m}$ - 30mm Polipropileno). Cada produto foi adicionado ao meio Potato Dextrose Agar Difco™ (3,9%) autoclavado (120°C por 20 minutos) com temperatura entre $45\text{-}60^\circ\text{C}$. Após a mistura, o meio foi vertido em placas de Petri (9 cm) (Figura 7C, D, E).

Depois de solidificado, um círculo de 0,5 cm de diâmetro foi retirado da parte central das placas com o auxílio de um furador de cobre estéril para então substituí-lo por um círculo de 0,5 cm de diâmetro proveniente de colônias contendo somente micélio. As placas foram incubadas por sete dias a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase. Foram utilizadas cinco repetições (placa) por produto químico por fungo (Figura 7F, G, H).

Após este período de incubação, o crescimento da colônia foi medido com o auxílio de uma régua milimétrica em quatro pontos cardinais descontando-se o diâmetro inicial da colônia, sendo utilizado o valor médio das medições por placa para as análises estatísticas. Para a quantificação da esporulação, cada colônia foi transferida individualmente para tubos de vidro onde foram adicionados 1 mL de água destilada com 0,05% de espalhante adesivo Tween 80® e vedados com Parafilm®. Os conídios foram separados por agitação mecânica em Vortex (Biomixer) por cinco minutos, seguido de submersão em água com vibração ultrassônica por 30 segundos. A concentração de conídios/mL foi determinada em câmara de Neubauer após diluição seriada da suspensão original (ALVES, 1998) e convertida em número de conídios por colônia.

2.2.9.1.2 Efeitos dos agroquímicos na viabilidade de conídios

Para avaliação dos efeitos dos produtos na viabilidade dos conídios foram utilizadas suspensões na concentração de 1×10^6 conídios/mL com 0,075% do adjuvante KBRAdj, em tubos tipo Falcon de 10 mL e adicionado cada agroquímico na dose e 50% da dose recomendada e homogeneizado por agitação mecânica em Vortex (Biomixer). Foram

utilizados cinco tubos (repetições) por produto por fungo. Os tubos foram transferidos para câmara climatizada tipo B.O.D. a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por duas horas (valores escolhidos baseados em observações pessoais da temperatura média da calda em tanque pulverizador e do tempo máximo entre a mistura no tanque e a aplicação na cultura). Após as duas horas de incubação, 140 μL das misturas foram retirados para avaliação da viabilidade dos conídios. Este volume foi transferidos para placas de Petri “Rodac” (Cinco placas por produto por fungo) contendo 4 mL de meio Batata Dextrose Ágar, antibiótico veterinário a 0,5% e Derosal® 500 SC a 0,01% como já descrito no item 2.2.4 (OLIVEIRA, 2009) e colocadas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 horas. O percentual de conídios germinados e não germinados foi avaliado em microscópio óptico.

2.2.9.2 Avaliação *in vivo*

2.2.9.2.1 Efeitos dos agroquímicos na mortalidade causada pelos fungos nos insetos e na esporulação dos cadáveres

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos 27 agroquímicos na patogenicidade dos fungos entomopatogênicos, 20 insetos adultos de *D. citri* foram transferidos para cada muda de Limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) confinados em gaiolas individuais de 20 cm de altura (Como descrito no item 2.2.6). Foram feitas suspensões fúngicas de *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na concentração de 5×10^6 conídios viáveis/mL com 0,075% do adjuvante KBRAdj, e cada agroquímico na dose recomendada para a cultura. As misturas foram homogeneizadas por agitação mecânica em Vortex (Biomixer) e os tubos transferidos para câmara climatizada tipo B.O.D. a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por duas horas.

As aplicações fúngicas + produto químico, foram realizadas com um pulverizador tipo “airbrush” num volume de 700 μL por planta (até molhamento das folhas, mas anterior ao ponto de escorrimento) por uma das aberturas laterais da gaiola. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e fotofase de 12 h por 10 dias. As avaliações foram realizadas diariamente e os insetos mortos colocados em câmara úmida por 72h a 26°C para a confirmação da infecção pela esporulação dos fungos nos cadáveres. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições/tratamento e o experimento repetido duas vezes no tempo. Foi incluído um tratamento com o inseticida químico Dimexion (0,1 mL/100 mL) e uma testemunha só com pulverização de água e outra com água + adjuvante.

Devido ao grande número de tratamentos e a limitação na obtenção de insetos para os bioensaios, não foi possível realizar a aplicar dos 27 agroquímicos isoladamente (sem o

fungo) para estimar a contribuição de cada produto na mortalidade. Entretanto, foi escolhido um representante de cada categoria de produtos e o experimento foi repetido aplicando-se o agroquímico isoladamente, o agroquímico + 0,075% KBRAdj, o fungo *B. bassiana* + agroquímico + 0,075% KBRAdj e os seguintes controles: *B. bassiana* + 0,075% KBRAdj, 0,075% KBRAdj isoladamente, somente água e *I. fumosorosea* + 0,075% KBRAdj. Foram escolhidos os seguintes produtos por categoria Iharol (Fungicida, Inseticida, Acaricida), Triunfo 515 (Fertilizante foliar), Envidor (Acaricida), Nufos (Inseticida Acaracida), Karate (Inseticida) e estes foram aplicados na dose recomendada (Tabela 2).

Figura 7 - Estudos de compatibilidade dos agroquímicos utilizados na cultura dos citros com os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296. **A.** Agroquímicos armazenados em capela com sistema de exaustão, **B.** Preparação da solução Hidróxido de cobre equivalente à concentração utilizada no campo para 1000 L/Ha, **C.** Pesagem de cada produto para uma solução de 4 L, **D.** Placas de Petri contendo o meio DifcoTM Potato Dextrose Agar (3,9%) e cada produto químico, **F.** Extração de meio sólido na parte central da placa de Petri com um furador (Ø 0,5 cm), **G.** Colônia de fungo com micélio para inoculação por disco de meio de 0,5 cm (Ø), **H.** Micélio transferido para o meio sólido contendo o produto químico, **I.** Tratamento controle com crescimento normal do fungo *B. bassiana* em meio BDA sem adição de produto químico, dez dias após incubação em B.O.D. a 26°C

2.2.9.3 Análises estatísticas

Os dados de crescimento e esporulação das colônias e viabilidade dos conídios *in vitro* e mortalidade dos insetos e a esporulação nos cadáveres *in vivo* foram submetidos à análise de

variância (teste F), as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013).

Para determinar o efeito tóxico dos produtos nos fungos entomopatogênicos, foi utilizado o modelo matemático descrito por Rossi-Zalaf et al. (2008), utilizando as variáveis de crescimento vegetativo, esporulação do fungo e viabilidade dos conídios com a expressão matemática $IB = 47 (CV) + 43 (ESP) + 10 (GER)/100$, sendo IB = índice biológico; CV = crescimento vegetativo da colônia; ESP = esporulação da colônia; GER = germinação dos conídios. Os valores obtidos de IB foram comparados com os limites descritos pelo autor (0 a 41 tóxico, 42 – 66 moderadamente compatível e > 66 compatível).

Com os dados obtidos na avaliação da compatibilidade dos fungos com os agroquímicos utilizados neste estudo, foi desenvolvido um modelo matemático avaliando conjuntamente os parâmetros de crescimento vegetativo, esporulação e germinação em placa e mortalidade dos insetos e esporulação dos cadáveres submetidos à aplicação dos fungos *B. bassiana* ESALQ – PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ – 1296 com cada um dos 27 agrotóxicos. Os parâmetros foram estimados pelo método dos quadrados mínimos e a seleção dos parâmetros a serem incluídos no modelo foram determinados pela estatística F e a técnica de Jackknife foi usada para a obtenção dos intervalos de confiança utilizando-se o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013).

O modelo matemático é descrito a seguir: $CT = [15 (CV) + 18 (ESP) + 20 (GER) + 36 (MORT) + 11 (ESP-CAD)]/100$, sendo CT = Classificação toxicológica, CV = crescimento vegetativo da colônia em cm; ESP = número de conídios por colônia; GER = porcentagem de germinação dos conídios; MORT = porcentagem de mortalidade dos insetos; ESP-CAD = porcentagem de cadáveres esporulados pelo fungo. Os valores obtidos de CT foram comparados com os limites obtidos pela técnica de Jackknife (0-49 tóxico, 50–75 moderadamente compatíveis e > 75 compatível).

Uma terceira análise foi realizada, criando-se uma classificação toxicológica baseada exclusivamente os resultados de mortalidade dos insetos pulverizados com as misturas de fungo com os agroquímicos. Foram considerados compatíveis os produtos cujas misturas com o fungo tenham causado mortalidades semelhantes a aplicação do fungo isoladamente. Foram considerados produtos incompatíveis aqueles cujas misturas com o fungo tenha resultado em mortalidades iguais a aplicação de água com o adjuvante. Os produtos que não se enquadraram nestas categorias foram considerados moderadamente compatíveis. Considerou-se mortalidade semelhante tratamentos cujos valores de mortalidade mais ou menos os desvios padrão das médias se sobrepuseram.

Tabela 2 - Agroquímicos mais utilizados na cultura dos citros, testados para determinar a compatibilidade toxicológica com os fungos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296

Nome comercial	Grupo químico	Ingrediente ativo	Concentração	DR	Titular registro
Acaricida					
Envidor SC	Cetoenol	Espirodiclofeno	24% m/v (240 g/L)	20 – 25 ml/100 L	Bayer
Omite 720 EC	Sulfito de alquila	Propargito	720 g/l (72% m/v)	100 ml/100 L	Chemtura
Enxofre fersol 520 SC	Inorgânico	Enxofre	800 g/L	400 g/100 L	Ameribras
Adjuvante/Fertilizante					
Cerium plus*	-----	N - (Densidade)	10% (1,10g/ml)	100 – 250 mL/ha	Microfol
Qualy TopSpray*	-----	N - (Densidade)	10% (1,10g/ml)	100 – 330 mL/ha	Brasilquímica
Fertilizante foliar					
Triunfo 515	-----	N, P ₂ O ₅	5%, 15%	10 – 20 mL/100 L	Produquímica
Triunfo flex	-----	N, P ₂ O ₅	6%, 12%	10 – 20 mL/100 L	Produquímica
Triunfo neutrum	-----	N, P ₂ O ₅	9%, 2%	10 – 20 mL/100 L	Produquímica
Profol citrus máster	-----	N, B, Mn, Mo, Zn	10%, 0,5%, 3%, 0,1%, 4%	3 L/2000 L	Produquímica
Fungicida					
Kentan 40 WG	Inorgânico	Hidróxido de Cobre	656 g/Kg	75 - 100 g/100 L	Isoagfro
Comet EC	Estrobilurina	Carbamato	250 g/L (25,0% m/v)	15 ml/100 L	BASF
Flint 500 WG	Estrobilurina	Trifloxistrobina	500 g/kg (50% m/m)	5 - 10 g/100 L	Bayer
Nativo SC	Estrobilurina	Trifloxistrobina	100 g/L (10% m/v)	30 - 40 ml/100 L	Bayer
Carbendazin Nortox SC	Benzimidazol	Carbendazin	500 g/L (50,0% m/v)	50 ml/100 L	Nortox
Inseticida biológico					
Dipel SC	Biológico	<i>Bacillus thuringiensis</i>	33,6 g/L	50 a 75 mL/100 L	FMC
Fungicida/bactericida					
Cupuran 500 PM	Inorgânico	Oxicloreto de cobre	840 g/Kg	220 g/100 L	Dupont
Inseticida/acaricida					
Nufos 480 EC	Organofosforado	Clorpirifos	480 g/L (48% m/v)	100 - 150 ml/100 L	Cheminova
Abamectin nortox EC	Avermectinas	Abamectina	18 g/L (1,8 % m/v)	15 - 30 ml/mL	Nortox
Danimen 300 EC	Piretróide	Fenpropathrin	300 g/L	50 ml/100 L	Iharabras
Dimetoato CE	Organofosforado	Dimetoato	500 g/l ou 50% m/v		Nortox
Kraft 36 EC	Avermectinas	Abamectina	36,0 g/L (3,6 % m/v)	10 - 15 ml/100 L	Cheminova
Dimexion CE	Organofosforado	Dimetoato	400 g/L		Cheminova
Inseticida					
Karate zion 50 CS	Piretróide	Lamda-Cialotina	5,0% m/v (50 g/L)	15 - 20 ml/100 L	Syngenta
Tiger 100 EC	Éter piridiloxi-pro	Piriproxifem	100 g/L (10% m/v)	5 - 10 g/100 L	Sumitomo
Decis ultra 100 EC	Piretróide	Deltametrina	845,1 g/L (84,51% m/v)	3,5 - 7,5 ml/100 L	Bayer
Provado 200 SC	Neonicotinóide	Imidacloprido	200 g/L (20% m/v)	15 - 20 ml/100 L	Bayer
Inseticida/fungicida/acaricida					
Iharol CE	Hidrocarboneto	Óleo mineral	760 g/L (90% m/m)	1 -2 L/100 L	Iharabras

* Contém: Surfactantes aniônicos e não iônicos, espessante tixotrópico e estabilizante. DR: Dose recomendada

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Seleção de adjuvantes para aplicação com os fungos entomopatogênicos

2.3.1.1 Eficiência dos fungos com seis adjuvantes

Na comparação da eficácia dos tratamentos com fungos *Bb*-ESALQ-PL63 e *If*-ESALQ-1296 aplicados com seis adjuvantes em semi-campo no controle de *D. citri* (Figura 8), observou-se que exceto para Tween 80 0,001% a aplicação de todos os outros adjuvantes resultou em mortalidades maiores que o controle onde somente água foi aplicada. As pulverizações de todos os adjuvantes com os fungos resultaram em mortalidades maiores que os adjuvantes isoladamente. A aplicação dos fungos com Tween 80 0,001% resultou em baixos níveis de mortalidade (para *Bb*= 23,3±3,3% e *If*= 13,3±4,2%).

As mortalidades de *B. bassiana* com os adjuvantes variaram de 91,7±3,1% (KBRAAdj) a 73,3±4,7% (Break thru) e para *I. fumosoroseae* de 75,2±3,5% e 75,1± 4,8% (Agral e KBRAAdj) a 46,6±3,3% (Break thru). Para todos os adjuvantes os valores de mortalidade de *B. bassiana* foram superiores a *I. fumosoroseae*. A confirmação da esporulação nos cadáveres variou em função da espécie do fungo e do adjuvante. Nos tratamentos com KBRAAdj, 65% do insetos mortos no tratamento com *B. bassiana* e 64,4% dos insetos mortos no tratamento com *I. fumosoroseae* esporularam. Já para Agral estes valores foram de 45% para *B. bassiana* e 33,3% para *I. fumosoroseae*.

Os adjuvantes KBRAAdj e Silwet foram escolhidos para utilização nos estudos seguintes por apresentarem maiores mortalidades com os fungos. KBRAAdj foi escolhido para ser utilizado nas formulações futuras dos fungos, entre outras coisas, por ser de baixo custo e por apresentar toxicidade reduzida aos fungos permitindo um maior tempo de prateleira (dados não apresentados). Silwet pode contribuir para a mortalidade de algumas pragas quando adicionado no momento da aplicação, mas é tóxico quando incorporado nas formulações.

2.3.1.2 Determinação da concentração de conídios e dos adjuvantes

Neste estudo foi avaliado se o aumento da concentração dos fungos (de 5×10^6 para 1×10^7 conídios/mL) e/ou do adjuvante Silwet L-77 (de 0,025% para 0,05%), em relação as concentrações usadas no experimento anterior, resultaria em maiores mortalidades de *D. citri*. Observou-se que nem o aumento na concentração do fungo nem do adjuvante resultou em aumentos significativos na mortalidade e nem na confirmação da porcentagem de cadáveres esporulados (Figura 9). O tratamento com Dimexion (0,1 mL/ 100 mL) também não

apresentou diferenças em relação aos tratamentos com fungo, que não apresentaram diferenças estatisticamente significativa entre si. Também não foram significativas as diferenças entre *B. bassiana* e *I. fumosorosea*. Todos os tratamentos com os fungos e com o pesticida químico foram superiores aos controles. A aplicação dos adjuvantes isoladamente resultou em mortalidades semelhantes de $23,7 \pm 2,6\%$ (Silwet 0,025%), $18,7 \pm 4,5\%$ (Silwet 0,05%) e $21,2 \pm 5,4\%$ (KBRAAdj) valores estes superiores ao controle somente com água, $13,7 \pm 3,6\%$. O restante dos tratamentos apresentaram mortalidades totais que variaram de $87,5 \pm 3,4\%$ (*B. bassiana* 1×10^7 conídios/mL + 0,05% Silwet L-77) a $78,7 \pm 4,5\%$ (*B. bassiana* 1×10^7 conídios/mL + 0,025% Silwet L-77) e confirmação de esporulação de $55,2 \pm 3,5\%$ (*I. fumosorosea* 5×10^6 conídios/mL + 0,075% KBRAAdj a $38,7 \pm 4,4\%$ (*I. fumosorosea* 5×10^6 conídios/mL + 0,05% Silwet L-77). Nos estudos realizados posteriormente o adjuvante KBRAAdj a 0,075% foi utilizado como padrão nos bioensaios de laboratório, semi-campo e campo.

Figura 8 - Teste em semi-campo da mortalidade de adultos de *D. citri* após 10 dias de exposição aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na concentração de 5×10^6 conídios/mL com seis adjuvantes diferentes e esporulação nos cadáveres após incubação em câmara úmida ($26^\circ\text{C} - 72$ h em B.O.D.). As barras de erro representam o erro padrão das médias. Barras indicadas pelas mesmas letras (Minúsculas para a mortalidade e maiúsculas para a esporulação), não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey HDS - 0,05

Figura 9 - Testes em semi-campo da mortalidade de adultos de *D. citri* após 10 dias de exposição de diferentes concentrações dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *I. fumosorosea* e dos adjuvantes Silwet L-77 e KBRAdj e esporulação nos cadáveres após incubação em câmara úmida (26°C – 72 h em B.O.D.). **T1.** *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (5×10^6 conídios/mL) + Silwet L-77 (0,025%), **T2.** *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (5×10^6 conídios/mL) + Silwet L-77 (0,05%), **T3.** *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (1×10^7 conídios/mL) + Silwet L-77 (0,025%), **T4.** *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (1×10^7 conídios/mL) + Silwet L-77 (0,05%), **T5.** *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (5×10^6 conídios/mL) + KBRAdj (0,075%), **T6.** *B. bassiana* ESALQ-PL63 (5×10^6 conídios/mL) + Silwet L-77 (0,025%), **T7.** *B. bassiana* ESALQ-PL63 (5×10^6 conídios/mL) + Silwet L-77 (0,05%), **T8.** *B. bassiana* ESALQ-PL63 (1×10^7 conídios/mL) + Silwet L-77 (0,025%), **T9.** *B. bassiana* ESALQ-PL63 (1×10^7 conídios/mL) + Silwet L-77 (0,05%), **T10.** *B. bassiana* ESALQ-PL63 (5×10^6 conídios/mL) + KBRAdj (0,075%), **T11.** Silwet L-77 (0,025%), **T12.** Silwet L-77 (0,05%), **T13.** KBRAdj (0,075%), **T14.** Dimexion (0,1 mL/ 100 mL), **T15.** Controle. As barras de erro representam o erro padrão das médias. Barras indicadas pelas mesmas letras (Minúsculas para a mortalidade e maiúsculas para a esporulação), não são significativamente diferentes (Tukey HDS - 0,05)

2.3.2 Eficiência dos fungos em laboratório

Para confirmar a reprodutibilidade da eficiência de controle com *Bb*-ESALQ-PL63 e *If*-ESALQ-1296 na concentração de 5×10^6 conídios/mL com o adjuvante KBRAdj 0,075% no controle de adultos de *D. citri* foram realizados bioensaios em condições de laboratório repetidos quatro vezes no tempo (Figura 10). Nos bioensaios 1 e 4 o tratamento com *B. bassiana* foi superior a *I. fumosorosea* mas nos dois outros bioensaios os resultados foram semelhantes. Entretanto, na análise fatorial Tukey-Kramer dos tratamentos ao longo do tempo não observou-se diferenças significativas entre os fungos, tanto para mortalidade total quanto para confirmação de esporulação nos cadáveres (Figuras 11-12). Em todos os bioensaios os tratamentos com fungos foram superiores ao controle e a aplicação com somente adjuvante.

Observou-se mortalidades totais que variaram entre $80,1 \pm 5,1\%$ e $76,2 \pm 5,6\%$ para *B. bassiana* (5×10^6 conídios/mL + 0,075% KBRAdj) e entre $83,7 \pm 3,4\%$ e $58,4 \pm 4,9\%$ para *I. fumosorosea* (5×10^6 conídios/mL + 0,075% KBRAdj). As porcentagens de insetos com confirmação da esporulação do fungo foram relativamente altas e variaram entre $58,5 \pm 4,9\%$ e $41,8 \pm 3,9\%$ para *B. bassiana* e entre $61,0 \pm 5,8\%$ a $39,4 \pm 3,6\%$ para *I. fumosorosea*.

Figura 10 - Testes em laboratório da mortalidade de adultos de *D. citri* após 10 dias de exposição aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na concentração de 5×10^6 conídios/mL com 0,075% do adjuvante KBRAdj e esporulação nos cadáveres após incubação em câmara úmida (26°C – 72 h em B.O.D.). As barras de erro representam o erro padrão das médias. Barras indicadas pelas mesmas letras (Minúsculas para a mortalidade e maiúsculas para a esporulação) não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey HDS - 0,05

Figura 11 - Análise fatorial da mortalidade ($F= 1,60$ $P= 0,1246$) dos testes em laboratório (Tratamentos Vs tempo) pelo teste de Tukey (0,05) no programa SAS. **T1.** *I. fumosorosea* (5×10^6 conídios/mL) + 0,075% do KBRAdj , **T2.** *B. bassiana* (5×10^6 conídios/mL) + 0,075% do KBRAdj , **T3.** 0,075% do KBRAdj , **T4.** Controle

Figura 12 - Análise fatorial da esporulação ($F= 0,29$ $P= 0,8306$) dos testes em laboratório (Tratamentos Vs tempo) pelo teste de Tukey (0,05) no programa SAS. **T1.** *I. fumosorosea* (5×10^6 conídios/mL) + 0,075% do KBRAdj , **T2.** *B. bassiana* (5×10^6 conídios/mL) + 0,075% do KBRAdj , **T3.** 0,075% do KBRAdj , **T4.** Controle

2.3.3 Eficiência dos fungos em semi-campo

Os três testes em semi-campo confirmaram a reprodutibilidade da eficiência de controle com *Bb*-ESALQ-PL63 e *If*-ESALQ-1296 na concentração de 5×10^6 conídios/mL com KBRA_{adj} 0,075% no controle de adultos de *D. citri* com resultados semelhantes aqueles obtidos em laboratório (Figura 13). Nos três bioensaios, não se observou diferenças significativas entre o tratamento com *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, revelado pelas análises de cada teste individualmente da mortalidade total e da confirmação da esporulação por ANOVA e pela análise fatorial Tukey-Kramer dos tratamentos ao longo do tempo (Figura 14-15). Em todos os bioensaios, os tratamentos com fungos foram superiores ao controle e a aplicação com somente adjuvante. Da mesma forma, a aplicação do adjuvante causou mortalidade maior (de $35 \pm 6,8\%$ a $20,1 \pm 4,6\%$) do que o controle somente com pulverização de água ($15,4 \pm 4,4\%$ a $13,8 \pm 3,2\%$).

Observou-se mortalidades totais que variaram de $88,8 \pm 3,9\%$ a $80 \pm 3,7\%$ para *B. bassiana* e entre $83,8 \pm 4,5\%$ e $73,8 \pm 5,5\%$ para *I. fumosorosea*. As porcentagens de insetos com confirmação da esporulação do fungo foram relativamente altas e variaram entre $65 \pm 3,9\%$ e $56,3 \pm 3,7\%$ para *B. bassiana* e entre $58,8 \pm 4,5\%$ a $50 \pm 3,9\%$ para *I. fumosorosea*.

Figura 13 - Testes em semi-campo da mortalidade (média±erro padrão) de adultos de *D. citri* após 10 dias de exposição aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na concentração de 5×10^6 conídios/mL com 0,075 do KBRA_{adj} e esporulação nos cadáveres após incubação em câmara úmida (26°C – 72 h em B.O.D.). Barras indicadas pelas mesmas letras (Minúsculas para a mortalidade e maiúsculas para a esporulação), não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey HDS - 0,05

Figura 14 - Análise fatorial da mortalidade ($F= 3,11$ $P= 0,0084$) dos testes em semi-campo (Tratamentos Vs tempo). **T1.** *I. fumosorosea* (5×10^6 conídios/mL) + 0,075% do KBRAdj, **T2.** *B. bassiana* (5×10^6 conídios/mL) + 0,075% do KBRAdj, **T3.** 0,075% do KBRAdj, **T4.** Controle

Figura 15 - Análise fatorial da . esporulação ($F= 0,16$ $P= 0,8502$) dos testes em semi-campo (Tratamentos Vs tempo). **T1.** *I. fumosorosea* (5×10^6 conídios/mL) + 0,075% do KBRAdj, **T2.** *B. bassiana* (5×10^6 conídios/mL) + 0,075% do KBRAdj, **T3.** 0,075% do KBRAdj, **T4.** Controle

2.3.4 Eficiência dos fungos em pomares de produção comercial de laranja

Nas 12 pulverizações realizadas durante o período de Dezembro de 2011 a Janeiro de 2013 em campo, obtiveram-se mortalidades de adultos de *D. citri* que variaram de $96,4 \pm 3,8\%$ (dezembro/2011) a $66,7 \pm 3,9\%$ (abril/2012) para *I. fumosorosea* a $2,5 \times 10^6$ conídios/mL em 2000 L/ha e $94,4 \pm 3,6\%$ (junho/2012) a $57,8 \pm 3,5\%$ (outubro/2012) para *I. fumosorosea* a 5×10^6

conídios/mL em 1000 L/ha (Figura 16). Para *B. bassiana* a $2,5 \times 10^6$ conídios/mL em 2000 L/ha a mortalidade variou de $95,6 \pm 2,4\%$ (maio/2012) a $72,5 \pm 3,9\%$ (janeiro/2012) e a 5×10^6 conídios/mL em 1000 L/ha variou de $87,8 \pm 3,8\%$ (maio/2012) a $61,7 \pm 3,6\%$ (setembro/2012). Nas parcelas com aplicação de pesticida químico em 1000 L/ha obteve-se mortalidades entre $93,9 \pm 2\%$ (maio/2012) e $72,2 \pm 3,5\%$ (outubro/2012). Nas parcelas onde aplicou-se somente água observou-se mortalidades entre $32,2 \pm 3,7\%$ (junho/2012) e $17,2 \pm 5,4\%$ (dezembro/2011) e nas parcelas sem nenhuma aplicação as mortalidades variaram de $30,3 \pm 3,2\%$ (janeiro/2012) e $16,5 \pm 5,2\%$ (outubro/2012) (dados não apresentados na figura). Em nenhum dos meses detectou-se diferenças significativas entre o tratamento com aplicações de água e o tratamento sem nenhuma aplicação. Em novembro de 2012 foi incluído um tratamento com aplicação do adjuvante sem o fungo e resultou em $29,4 \pm 6,2\%$ de mortalidade, valores próximos aos obtidos em laboratório e semi-campo.

Na comparação mês a mês, somente em janeiro de 2012 o controle químico foi superior a todos os outros tratamentos. No restante dos meses, as mortalidades causadas pelos tratamentos com fungos foram semelhantes ao controle químico. Na análise fatorial ao longo do tempo, observa-se que todos os tratamentos foram superiores ao controle com aplicação de água (Figura 17). O controle químico não diferiu do tratamento com *I. fumosorosea* a $2,5 \times 10^6$ conídios/mL em 2000 L/ha, mas foi superior aos demais e este tratamento com *I. fumosorosea* foi superior somente ao tratamento com *B. bassiana* a 5×10^6 conídios/mL em 1000 L/ha. Os demais tratamentos com fungo não diferiram entre si.

A avaliação da conidiogênese dos fungos nos cadáveres dos adultos de *D. citri*, que além de confirmar a mortalidade pelo fungo também é um parâmetro que indica o potencial de disseminação no ambiente. Os valores mais elevados do número de insetos esporulados foram observados no período chuvoso, de novembro a março, sendo as porcentagens máximas de $69,4 \pm 3,5\%$ para *I. fumosorosea* a $2,5 \times 10^6$ conídios/mL e 2000 L/ha em dezembro/2011 e $60,1 \pm 4,8\%$ para *B. bassiana* a 5×10^6 conídios/mL e 1000 L/ha em janeiro/2012 (Figura 16). E os valores mais baixos observados foram no período seco, de maio a setembro, sendo as porcentagens mínimas de $7,4 \pm 2,4\%$ para *I. fumosorosea* a 5×10^6 conídios/mL e 1000 L/ha em setembro/2012 e $12,2 \pm 3,5\%$ para *B. bassiana* a 5×10^6 conídios/mL e 1000 L/ha, em setembro/2012. Apenas em quatro meses observou-se diferenças significativas na porcentagem de cadáveres esporulados. Em dezembro/2011, o tratamento *B. bassiana* a 5×10^6 conídios/mL e 1000 L/ha apresentou valores menores que os demais tratamentos. Em agosto/2012, os dois tratamentos com *B. bassiana* foram superiores a *I. fumosorosea* e em setembro/2012 o tratamento com *I. fumosorosea* a $2,5 \times 10^6$ conídios/mL e 2000 L/ha foi

inferior aos demais. Já em outubro/2012, o tratamento a base de *I. fumosorosea* a $2,5 \times 10^6$ conídios/mL e 2000 L/ha foi superior aos demais. A variação na porcentagem de cadáveres esporulados ao longo do ano foi elevada, e a análise fatorial deste parâmetro ao longo do tempo não detectou diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 17).

De maio a setembro/2012, quando se observou os menores valores de esporulação coincidiu com quatro meses sem nenhuma precipitação e os menores valores de temperatura máxima (Figura 18). Nos meses de junho a setembro ocorreram os menores valores de umidade relativa tanto máxima quanto mínima. Especialmente, no mês de setembro que foi o mês de menores valores de esporulação também se observou os menores valores de umidade máxima e mínima. Nas análises de regressão múltipla *stepwise*, os valores de R^2 foram obtidos para o parâmetro esporulação de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* nos tratamentos com 1000 L/ha forma de $R^2 = 0,823$ e $R^2 = 0,966$, respectivamente, e os valores de P ficaram próximos ao nível de significância para as correlações entre a umidade relativa máxima e a esporulação de *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, sendo $P = 0,073$ e $0,109$, respectivamente (Tabela 3). Entretanto, o mesmo não foi detectado nos tratamentos com os fungos a 2000 L/ha.

Os únicos parâmetros que apresentaram valores significativos de P nas análises de regressão múltipla *stepwise* foram umidade máxima e mortalidade por *B. bassiana* a 5×10^6 conídios/mL e 1000 L/ha com valor de $b = 0,652$ ($p = 0,035$); umidade mínima e mortalidade no controle com valor de $b = -0,587$ ($p = 0,032$) e precipitação e esporulação de *I. fumosorosea* a 5×10^6 conídios/mL e 1000 L/ha com valor de $b = 0,978$ ($p = 0,015$) (Tabela 3). As duas primeiras correlações indicam que quanto maior a umidade máxima e umidade mínima, maior a mortalidade por *B. bassiana* e por outras causas, respectivamente; enquanto que a terceira correlação indica que quanto maior o volume de chuvas maior a esporulação de *I. fumosorosea*.

Em nenhuma das comparações feitas a cada aplicação entre 1000 L/ha e 2000 L/ha observou-se diferenças significativas tanto para *I. fumosorosea* quanto para *B. bassiana*. Entretanto, pelas análises de regressão múltipla *stepwise* o tratamento com *B. bassiana* a $2,5 \times 10^6$ conídios/mL e 2000 L foi superior a 5×10^6 conídios/mL e 1000 L/ha. Já para *I. fumosorosea* a eficiência de controle não foi diferente entre 2000 L e 1000 L/ha. Em setembro obteve-se em geral os menores valores de mortalidade nos tratamento no período onde registrou-se os menores valores de umidade relativa. Nesta avaliação, embora não tenha sido detectadas diferenças estatisticamente significativas entre 2000 L e 1000 L/ha, há uma tendência de valores numericamente maiores para a aplicação a 2000 L. Isto poderia ser

explicado por um maior molhamento a 2000 L e uma cobertura insuficiente (mesmo com o produto químico) no tratamento a 1000 L pela evaporação das gotas menores antes de atingir a planta. Entretanto, o maior custo de aplicação de 2000 L de calda em relação a 1000 L dificilmente compensaria o ganho de uma maior mortalidade a 2000 L. Desta forma, os resultados indicam que a aplicação dos fungos a 1000 L/ha seja mais adequado. Estudos estão em andamento para determinar a menor dose eficiente em função da cubicagem da área foliar das copas das árvores.

A mortalidade satisfatória, mas a menor esporulação nos cadáveres durante a época seca permite afirmar que o produto formulado consegue matar o inseto nesta época, mas o processo de colonização e reprodução dos fungos é afetado pelas condições ambientais. Não se espera nesta época então, uma ciclagem do fungo no ambiente o que deve acontecer no período das chuvas onde os cadáveres esporulados irão gerar novos ciclos de infecção.

A precipitação parece não afetar a mortalidade natural dos adultos de *D. citri*, baseado no na análise de regressão múltipla stepwise para correlação do parâmetro mortalidade versus precipitação ($p= 0,1217$) no controle (Tabela 4). Nos quatro meses de maiores precipitações, janeiro, março e dezembro/2012 e janeiro/2013 (34,9; 29,2; 16,3 e 19,3 mm em 10 dias) a média das mortalidades naturais foi de 25,1%. Por outro, nos quatro meses sem nenhuma precipitação, maio a setembro/2012 a média das mortalidades naturais foi de 24,8%.

Figura 16 - Testes em campo da mortalidade de adultos de *D. citri* após exposição aos fungos entomopatogênicos com 0,075% do KBRAdj. **T1.** *B. bassiana* ESALQ-PL63 ($2,5 \times 10^6$ conídios/mL) em 2000 L/ha, **T2.** *B. bassiana* ESALQ-PL63 (5×10^6 conídios/mL) em 1000 L/ha, **T3.** *I. fumosorosea* -ESALQ-1296 ($2,5 \times 10^6$ conídios/mL) em 2000 L/ha, **T4.** *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (5×10^6 conídios/mL) em 1000 L/ha, **T5.** Controle químico, **T6** Controle (Água). As medias foram comparadas pelo teste de Tukey HDS (0,05)

Figura 17 - Análise fatorial dos testes de campo (Tratamentos Vs tempo). **A.** Mortalidade ($F= 1,70$ $P= 0,0025$), **B.** Esporulação ($F= 7,22$ $P= 0,0001$). **T1.** *B. bassiana* ESALQ-PL63 ($2,5 \times 10^6$ conídios/mL) em 2000 L/ha, **T2.** *B. bassiana* ESALQ-PL63 (5×10^6 conídios/mL) em 1000 L/ha, **T3.** *I. fumosorosea* - ESALQ-1296 ($2,5 \times 10^6$ conídios/mL) em 2000 L/ha, **T4.** *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (5×10^6 conídios/mL) em 1000 L/ha, **T5.** Controle químico, **T6** Controle (Água). Tukey HDS (0,05)

Figura 18 - Condições ambientais. **A.** Temperatura (máxima e mínima), **B.** Umidade relativa (máxima e mínima) e Precipitação acumulada (PP) no pomar comercial de laranja (Área experimental) em Itapetininga/SP ao longo do período de avaliação

Tabela 3 - **Testes em campo.** Análises de regressão múltipla *stepwise* das variáveis independentes [temperatura e umidade (máxima e mínima) e precipitação] e das variáveis dependentes ou resposta (mortalidade dos adultos de *D. citri* e esporulação nos cadáveres pelos fungos *B. bassiana* e *I. fumosorosea*)

<i>Beauveria bassiana</i> (5x10⁶ conídios/mL)								
1000 L/ha					2000 L/ha			
Mortalidade R ² = 0,7725 F = 2,8291			Esporulação R ² = 0,8232 F = 3,8810		Mortalidade R ² = 0,5924 F = 1,2114		Esporulação R ² = 0,8742 F = 5,7923	
	B	p	B	P	b	p	b	p
Intercepto	80,064	0,0025	-7,5703	0,7689	92,4727	0,0123	5,7797	0,7794
UR máxima	0,6521	0,0352	0,8752	0,0733	0,3470	0,4069	0,2548	0,4488
UR mínima	-0,0186	0,9502	0,0506	0,9203	0,0544	0,9137	0,9187	0,0631
T° media	-1,233	0,4906	1,0081	0,7353	-0,3525	0,9045	-0,9483	0,6922
T° máxima	-0,7103	0,5767	-2,0594	0,3556	0,0691	0,9738	-0,4674	0,7848
T° mínima	-0,8802	0,3784	-0,1363	0,9333	-2,2452	0,2034	-1,5423	0,2693
PP	-0,1561	0,4128	0,4686	0,1759	-0,3918	0,241	0,5543	0,0675

<i>Isaria fumosorosea</i> (5x10⁶ conídios/mL)								
1000 L/ha					2000 L/ha			
Mortalidade R ² = 0,6527 F = 1,2530			Esporulação R ² = 0,9663 F = 9,4043		Mortalidade R ² = 0,5908 F = 1,2030		Esporulação R ² = 0,7601 F = 2,6402	
	B	p	B	P	b	p	b	P
Intercepto	114,4916	0,0234	13,4871	0,5306	106,108	0,0117	-8,1875	0,8332
UR máxima	-0,0125	0,9875	0,9414	0,1092	0,1905	0,679	0,3985	0,5263
UR mínima	0,7027	0,5993	-0,9031	0,2983	0,0003	0,9996	1,1121	0,1873
T° media	-8,468	0,2785	2,6483	0,5575	-4,9918	0,1752	-2,4055	0,5970
T° máxima	4,8646	0,3477	-2,0789	0,4998	3,0004	0,2434	0,1240	0,9692
T° mínima	-2,2267	0,343	-0,3669	0,7870	-1,1689	0,5309	-1,3542	0,5884
PP	0,1699	0,6853	0,9785	0,0149	0,2046	0,5663	0,6536	0,2059

Tabela 4 - **Testes em campo.** Análises de regressão múltipla *stepwise* das variáveis independentes [temperatura e umidade (máxima e mínima) e precipitação] e da variável dependente ou resposta (mortalidade dos adultos de *D. citri*) no tratamento químico e controle

	Químico		Controle	
	1000 L/ha			
	Mortalidade			
	R ² = 0,6489 F = 1,5402		R ² = 0,7725 F = 2,8291	
	b	p	b	p
Intercepto	89,2269	0,0039	34,5099	0,0187
UR maxima	0,3413	0,2777	0,3000	0,1190
UR minima	0,25895	0,4912	-0,5868	0,0318
Tº media	-2,8042	0,2281	0,0587	0,9617
Tº máxima	0,6741	0,6649	-0,4774	0,5925
Tº mínima	-0,7435	0,5369	0,7749	0,2799
PP	0,0763	0,7376	0,2286	0,1217

2.3.5 Compatibilidade dos fungos com os produtos fitossanitários mais utilizados na cultura dos citros

Para o fungo *B. bassiana* (Tabela 5), dentre os acaricidas, Envidor não afetou nem o crescimento vegetativo nem a esporulação. Omite 500WP e Enxofre Fersol 520SC reduziram o crescimento vegetativo (37,5% e 50% em relação ao controle) e somente o enxofre reduziu a esporulação (2,8% do controle). Enxofre também reduziu drasticamente a germinação dos conídios sendo que mesmo na meia dose a germinação foi de 51,5%. Os demais acaricidas não afetaram a germinação, exceto Envidor que embora tenha sido estatisticamente menor do que o controle apresentou valores satisfatórios de viabilidade (90%). As pulverizações de *B. bassiana* com os produtos resultaram em mortalidades de adultos de *D. citri* entre 51,5% (enxofre) e 73,5% (Envidor). A porcentagem de cadáveres esporulados foi $\leq 21,5\%$. Estes dados mostram que Envidor é o acaricida é mais compatível e Enxofre o menos compatível com *B. bassiana*.

Os espalhantes Cerium plus e QualyAplic apresentaram resultados semelhantes nos estudos de compatibilidade *in vitro*. Ambos reduziram o crescimento vegetativo, incrementaram a esporulação e não afetaram a germinação dos conídios. Embora as colônias cultivadas na presença destes produtos apresentassem 50% e 35% do tamanho das colônias no controle, a esporulação foi 195% e 267% superior ao controle. *B. bassiana* quando aplicado com Cerium plus resultou em 78,5% de mortalidade, e 43,3% dos cadáveres esporularam. Já quando QualyAplic reduziu a patogenicidade do fungo (59,5% de mortalidade e 30% de

esporulação). Desta forma, Cerium plus apresenta-se como o adjuvante mais compatível com o fungo.

Os fertilizantes foliares Triunfo 515, Triunfo flex e Tiunfo neutrum não apresentaram grandes diferenças entre si, nem do controle. Todos afetaram negativamente o crescimento vegetativo; nenhum afetou a esporulação e apenas Triunfo 515 afetou negativamente a viabilidade de conídios, ainda assim apresentou 91,8% de germinação na dose. A mortalidade dos adultos de *D. citri* pulverizados com estes produtos junto com *B. bassiana* foi relativamente alta ($\geq 76,5\%$). Já o Profol citrus máster apresentou resultados variáveis em função do parâmetro. Este tratamento apresentou menor esporulação *in vitro* (66,6% da esporulação no controle) e menor mortalidade (69,5%) e esporulação (10,1%) nos insetos, mas não afetou o crescimento nem a germinação do fungo.

Os efeitos dos fungicidas foram muito mais drásticos a *B. bassiana*, especialmente Nativo e Carbendazim que não permitiram nem o crescimento, nem a esporulação e germinação dos conídios mesmo na metade da dose recomendada. A mortalidade dos insetos aplicados com a mistura de *B. bassiana* com estes produtos foi igual a aplicação somente de água o que mostra que o fungicida inviabilizou o fungo e que não tem toxicidade a esta praga. Flint 500 WG reduziu o crescimento e a esporulação, não permitiu a germinação dos conídios *in vitro* e os resultado de mortalidade revela que o fungicida inviabilizou o fungo quando aplicados juntos. O efeito negativo do Comet foi maior na esporulação enquanto Kentan 40 WG afetou mais o crescimento vegetativo. A redução destes fungicidas na germinação dos conídios foi pequena, para valores próximos a 87%. Quando aplicados juntos com o fungo obtiveram-se mortalidades dos insetos de 20,1% e 33,7%, respectivamente, com 7% e 4,3% dos cadáveres esporulados indicando que a contribuição do fungo na mortalidade foi pequena devido ao efeito tóxico dos fungicidas.

O inseticida microbiano Dipel somente afetou a esporulação *in vitro* de *B. bassiana* (10,9% da esporulação do controle). Entretanto, a esporulação nos cadáveres aparentemente não foi afetada observando-se 42,7% dos insetos pulverizados esporularam.

O fungicida/Bactericida Cupuran 500 PM apresentou efeito drástico no crescimento e esporulação, mas não nenhum dos outros parâmetros, sendo que 51,4% dos insetos pulverizados esporularam.

Dentre os inseticidas/acaricidas, apenas Nufos 480CE, Danimen 300CE e Dimetoato afetaram negativamente o crescimento vegetativo e apenas Nufos 480CE, Dimetoato e Dimexion reduziram a esporulação. Por outro lado, a esporulação em Abamectin Nortox e kraft 36CE foi 201% e 366% superior ao controle. A germinação de conídios em Nufos

480CE, Danimen 300CE e Dimetoato foi estatisticamente menor do que no controle mas apresentou valores superiores 85,7%. A pulverização destes produtos conjuntamente com *B. bassiana* resultou em mortalidades entre 79% (Dimetoato) a 91,2% (Nufos 480CE). A porcentagem de cadáveres com fungo esporulado variou de 17,9% a 33,8%.

Dentre os produtos que somente apresentam atividade inseticida, Tiger 100 CE e Decis ultra 100 CE reduziram o crescimento vegetativo e Karate zeon 50 CS reduziu a esporulação. Tiger 100 CE e Provado 200 CS estimularam a esporulação (257% e 289% superior ao controle). Karate zeon 50 CS não afetou a germinação de conídios e quando aplicado junto com o fungo resultou na maior mortalidade de insetos (88,4%) sendo que 21,8 dos insetos apresentaram esporulação do fungo. Tiger 100 CE, Decis ultra 100 CE e Provado 200 CS reduziram a germinação de conídios, mas quando aplicados com o fungo resultaram em mortalidades acima de 76%. A porcentagem de cadáveres com esporulação do fungo variou de 15,7% a 19,5% para estes três produtos.

O produto Iharol, registrado como Inseticida/fungicida/bactericida, utilizado comumente como espalhante, reduziu o crescimento vegetativo, mas aumentou a esporulação. Não afetou a germinação de conídios e resultou em 94,3% de mortalidade quando aplicado com o fungo. A sua compatibilidade pode ser demonstrada pela porcentagem de insetos esporulados pelo fungo (42,3%).

Por outro lado, para o fungo *I. fumosorosea* (Tabela 6) dentre os acaricidas, Enxofre Fersol 520 SC não afetou o crescimento vegetativo, diferente do que se evidenciou com o Envidor e Omite 500 WP que reduziram o crescimento vegetativo (60,7% e 78,53% em relação ao controle). Já a esporulação apresentou redução com o Envidor, Omite e Enxofre (0,02%, 4,01% e 0,33% do controle). Enxofre também reduziu a germinação dos conídios sendo que mesmo na meia dose a germinação foi próxima da dose (83,66% e 88,7%). Os demais acaricidas não afetaram a germinação. As pulverizações de *I. fumosorosea* com os produtos resultaram em mortalidades de adultos de *D. citri* entre 34,4% (enxofre) e 57,6% (omite). A porcentagem de cadáveres esporulados foi $\leq 18,3\%$. Estes dados mostram que Omite e Envidor são os acaricidas mais compatível e o Enxofre o menos compatível com *I. fumosorosea*.

O espalhante Cerium plus apresentou valores de crescimento vegetativo semelhantes ao controle e o QualyAplic o reduziu significativamente (75% em relação ao controle). Por outra parte, os dois espalhantes apresentaram valores de esporulação e viabilidade dos conídios (dose e meia dose) muito próximos e que não diferiram estatisticamente. Quando pulverizado *I. fumosorosea* junto com estes espalhantes, resultaram em mortalidades de 49,2% (Cerium

plus) e 40,5% (QualyAplic), sendo que destes adultos mortos, esporularam 31,59% e 28,3% respectivamente. Ao se compararem estes resultados com os obtidos na mortalidade de *D. citri* e a esporulação do fungo nos cadáveres, ouve uma redução da patogenicidade com ambos os produtos, com valor de 49,2% de mortalidade e 31,6% de esporulação para cerium plus e 40,5% de mortalidade e 28,3% de esporulação para QualyAplic (em relação ao controle). Podendo sugerir que, os dois espalhantes são moderadamente compatíveis com o fungo.

Os fertilizantes foliares Triunfo 515, Triunfo flex e Triunfo neutrum não apresentaram grandes diferenças entre si, comparado com o controle. Nenhum afetou o crescimento vegetativo; Triunfo 515 e Triunfo flex estimularam a esporulação e apenas Triunfo 515 afetou negativamente a viabilidade de conídios, ainda assim apresentou germinação acima de 90% na dose e meia dose. A mortalidade dos adultos de *D. citri* pulverizados com Triunfo 515, Triunfo flex e Triunfo neutrum junto com *I. fumosorosea* foram relativamente altas ($\geq 70\%$). Já o Profol citrus máster apresentou resultados variáveis em função do parâmetro (50,5%). Este tratamento apresentou a menor mortalidade *in vitro* (51,5% com respeito do controle) e com esporulação apenas de 16,9% nos insetos, mas não afetou o crescimento nem a germinação do fungo.

Quando avaliados os fungicidas os resultados para cada uma das análises foram muito variáveis, Kentan 40 WG e Comet não apresentaram diferença significativa do controle no crescimento vegetativo e na esporulação, Flint 500 WG apresentou um crescimento de 60,7% (em relação ao controle) mas estimulou a esporulação num 274% em relação ao controle. Já Nativo e Carbendazim inibiram por completo o crescimento, esporulação e viabilidade do fungo. Quando analisados os resultados *in vivo*, os valores de mortalidade pela aplicação conjunta dos fungicidas com *I. fumosorosea* foram baixos (de 11,4% a 30,5%) em comparação á aplicação do fungo isoladamente, que apresentou mortalidade de 73,1%. Na esporulação do fungo nos cadáveres, os únicos resultados obtidos foram para Kentan e Comet, mas com uma redução drástica ($\leq 9,8\%$). Podendo assim, concluir que aplicações conjuntas de *I. fumosorosea* com os fungicidas testados, afeta negativamente o fungo e compromete o nível de controle de *D. citri* pelos seus efeitos tóxicos.

O inseticida microbiano Dipel não afetou o crescimento vegetativo da colônia e estimulou a esporulação *in vitro* de *I. fumosorosea* (158% com relação ao controle). Quando determinada a viabilidade na dose e meia dose recomendada do produto, só na primeira ouve uma redução significativa (91,3%), mas é um valor considerado alto nos parâmetros de qualidade de fungos entomopatogênicos e finalmente, a mortalidade dos adultos de *D. citri*

(79,32%) e a esporulação do fungo nos cadáveres (37,3%) não apresentaram diferença significativa em comparação ao controle; concluindo então que são viáveis as aplicações conjuntas do inseticida biológico Dipel com *I. fumosorosea*.

O fungicida/Bactericida Cupuran 500 PM apresentou efeito drástico no crescimento e esporulação (42,8% e 4,67% em relação ao controle), mas não nenhum dos outros parâmetros, sendo que a viabilidade dos conídios me manteve acima de 95%, a mortalidade dos adultos de *D. citri* foi de 92,78% e 47,4% dos insetos pulverizados esporularam.

Dentre os inseticidas/acaricidas, apenas Nufos 480CE afetou negativamente o crescimento vegetativo (42,8% em relação ao controle), já a esporulação nas colônias foi estimulada pelos produtos Dimetoato CE e Kraft 36 CE (321% e 301% em relação ao controle) e Nufos 480 CE, Abamectin nortox e Danimen 300 CE afetaram negativamente (0,28%, 12,3% e 29,8% do controle). Unicamente Danimen 300 CE e Dimetoato CE reduziram estatisticamente a germinação dos conídios do que no controle e só na meia dose apresentou valores superiores a 80%. A pulverização conjunta destes produtos com *I. fumosorosea* resultou em mortalidades consideradas altas, entre 74,6% (Abamectin nortox) e 92,9% (Kraft 36 CE) e esporulação dos cadáveres que variou de 17,2% (Dimexion) a 34,5% (Danimen 300 CE).

Na avaliação da toxicidade dos inseticidas ao fungo *I. fumosorosea*, só o Decis ultra 100 CE reduziu o crescimento vegetativo e só o Tiger 100 CE apresentou valores de esporulação semelhantes ao controle, já que Karate zeon 50 CS, Provado 200 CS e Decis ultra 100 CE foram significativamente menores ao controle (60,3%, 18,3% e 3,49% do controle). A maioria dos inseticidas não afetou a germinação dos conídios na dose e meia dose, só Tiger 100 CE na dose apresentou diferença significativa em relação ao controle, mas com um valor de 91,2% considerado alto na determinação de qualidade para uso dos fungos entomopatogênicos. Quando pulverizados os inseticidas em conjunto com *I. fumosorosea*, a mortalidade dos adultos de *D. citri* variou de 76,8% (Karate zeon 50 CS) a 81,43% (Tiger 100 CE), finalmente, a esporulação variou de 23,2% (Provado 200 CS) a 15,76% (Tiger 100 CE).

O produto Iharol, reduziu o crescimento vegetativo e a esporulação da colônia (78,6% e 31,5% do controle). Não afetou a germinação de conídios e resultou em 86,7% de mortalidade quando aplicado com o fungo e uma esporulação do fungo nos cadáveres de 29,8%.

Tabela 5 - Compatibilidade toxicológica dos agroquímicos com o fungo *B. bassiana* ESALQ-PL63. Avaliação *in vivo* (Crescimento, esporulação e viabilidade) e *in vitro* (Bioensaio em adultos de *D. citri*)

	Crescimento Vegetativo ¹ ± EP	Esporulação ² ± EP	Viabilidade (%)		Patogenicidade	
			DR ± EP	50 % DR ± EP	Mortalidade ³ ± DP	Esporulação ⁴ ± DP
Acaricida						
Testemunha	1,16 ±0,01 a	6,8±0,7E+08 ab	96,4 ±2,4 a	95,3 ±1,8 a	13,4 ±3,6 c	0
Envidor	1,36 ±0,04 a	2,6±0,8E+08 bc	90 ±1,5 b	93,3 ±1,8 a	75 ±9,7 a	21,5 ± 3,3 a
Omite 500 WP	0,6 ±0,01 b	35±0,7E+08 a	99,8 ±0,2 a	99,7 ±0,3 a	70 ± 6,7 a	13,4 ± 4 b
Enxofre fersol 520 SC	0,8 ±0,03 b	0,19±0,01E+08 c	50 ±4,4 c	55,4 ±4,9 b	51,5 ± 4,7 b	18,7 ± 5,4 a
Espalhante						
Testemunha	1,16 ±0,01 a	6,8±0,7E+08 b	96,4 ±2,4 a	95,3 ±1,8 a	13,4 ±3,6 c	0
Cerium plus	0,8 ±0,003 b	13±0,08E+08 a	97,5 ±1,3 a	98,3 ±0,9 a	78,5 ± 7,1 a	43,5 ± 14 a
QualyAplic TopSpray	0,56 ±0,003 b	18±2,1E+08 a	94,5 ±2,7 a	96,9 ±1,8 a	59,9 ± 4,26 b	30,1 ± 8,3 b
Fertilizante folhar						
Testemunha	1,16 ±0,01 a	6,8±0,7E+08 a	96,4 ±2,4 a	95,3 ±1,8 a	13,4 ±3,6 d	0
Triunfo 515	1 ± 0,004 bc	9,9±3,6E+08 a	91,8 ±2,5 b	91,9 ±1,4 b	88,3 ± 2,4 a	21,3 ± 12 a
Triunfo flex	0,64 ±0,004 c	22 ±2,4E+08 a	98,9 ±1,1 a	98,8 ±1,2 a	76,5 ± 7,2 b	17,5 ± 5,5 b
Triunfo neutrum	0,96 ±0,003 bc	11±1,9E+08 a	97,3 ±1,7 a	96,6 ±2,0 a	85,1 ± 3,3 a	15,1 ± 6,5 b
Profol citrus máster	1,56 ±0,004 a	4,5±2,7E+08 b	96,9 ±2,1 a	96,9 ±1,5 a	69,5 ± 7,4 c	10,1 ± 4,3 c
Fungicidas						
Testemunha	1,16 ±0,01a	6,8±0,7E+08 a	96,4 ±2,4 a	95,3 ±1,8 a	13,4 ±3,6 c	0
Kentan 40 WG	0,12 ±0,004 c	4,8 ±1,7E+08 a	87,8 ±3,2 b	93,8 ±2,9 a	33,7 ± 3,9 a	7,04 ± 3,6 a
Comet	1,8 ±0,003 a	0,2±0007E+08 b	87,7 ±2,7 b	88,9 ±3,5 b	20,1 ± 2,6 b	4,3 ± 2,2 b
Flint 500 WG	0,68 ±0,02 b	0,26±0,01E+08 b	0	0	8,4 ± 2,1 d	0
Nativo	0	0,00E+00	0	0	11,3 ± 1,9 c	0
Carbendazim	0	0,00E+00	0	0	9,1 ± 2,4 d	0
Inseticida biológico						
Testemunha	1,16 ±0,01a	6,8±0,7E+08 a	96,4 ±2,4 a	95,4 ±1,8 a	13,4 ±3,6 b	0
Dipel	1,56 ±0,01a	0,7±0,06E+08 b	95,2 ±1,9 a	96,3 ±2,1 a	88,3 ± 6,6 a	42,8 ±12,6
Fungicida bactericida						
Testemunha	1,6 ±0,02 a	6,8±0,7E+08	96,4 ±2,4 a	95,4 ±1,8 a	13,4 ±3,6 b	0
Cupuran 500 PM	0,2 ±0,003 b	0,00E+00	96 ±1,4 a	100 a	82 ± 10,5 a	51,4 ±14,4
Inseticida/acaricida						
Testemunha	1,6 ±0,02 a	6,8±0,7E+08 c	96,4 ±2,4 a	95,3 ±1,8 a	13,4 ±3,6 c	0
Nufos 480 CE	0,44 ±0,006 b	0,16 ±0,01E+08 f	87,2 ±1,3 b	87,2 ±1,7 b	91,2 ± 3,2 a	25,3 ± 10,5 b
Abamectin nortox	1,4 ±0,02 ab	14±1,7E+08 b	99,4 ±0,5 a	99,2 ±0,6 a	79,8 ± 5,4 b	21,6 ± 7,21 c
Danimen 300 CE	0,64 ±0,01 b	6,3±0,3E+08 c	88,1 ±0,5 b	92,6 ±0,4 b	84,7 ± 5,9 b	33,8 ± 8,4 a
Dimetoato CE	0,6 ±0,003 b	2,2±0,06E+08 e	85,7 ±1,4 b	87,7 ±2,2 b	79 ± 3,5 b	20,9 ± 8,1 c
Kraft 36 CE	1,04 ±0,003 ab	25 ±1,3E+08 a	99,8 ±0,2 a	99,2 ±0,6 a	88,6 ± 4,5 a	19,5 ± 7,1 d
Dimexion	1,76 ±0,001 a	8,8±0,8E+08 d	98,7 ±1,1 a	99,3 ±0,5 a	83,5 ± 6,2 b	17,9 ± 9,7 d
Inseticida						
Testemunha	1,6 ±0,01 a	6,8±0,7E+08 b	96,4 ±2,4 a	95,3 ±1,8 a	13,4 ±3,6 c	0
Karate zeon 50 CS	1,44 ±0,01 a	2,4±0,6E+08 c	95,8 ±1 a	95,2 ±1 a	88,4 ± 5,5 a	21,8 ± 6,7 a
Tiger 100 CE	0,36 ±0,004 b	17±0,6E+09 a	74 ±0,6 b	90,4 ±0,7 a	83,8 ± 4,9 b	19,5 ± 8,2 a
Decis ultra 100 CE	0,44 ±0,01 b	9,2±0,7E+08 b	25,1 ±0,4 c	24,7 ±2,3 c	80,1 ± 5,1 b	18,3 ± 7,7 a
Provado 200 CS	1,56 ±0,02 a	19 ±4,2E+08 a	87,7 ±0,8 b	87,6 ±1,3 b	76,5 ± 6,8 b	15,7 ± 8,2 b
Inseticida/fungicida /bactericida						
Testemunha	1,6 ± 0,01 a	6,8±0,7E+08 b	96,4 ±2,4 a	95,3 ±1,8 a	13,4 ±3,6 b	0
Iharol	0,72 ±0,02 b	29 ±2,8E+08 a	92,4 ±1,5 a	96,4 ±1,4 a	94,3 ± 2,12 a	42,3 ± 13,5

¹ Crescimento vegetativo da colônia (Cm), ² Esporulação da colônia (milhões de esporos), ³ Mortalidade de adultos de *D. citri* (%), ⁴ Esporulação nos cadáveres de adultos de *D. citri* (%). Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05). Análise estatística realizada dentro grupo de produtos químicos.

Tabela 6 - Compatibilidade toxicológica dos agroquímicos com o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296. Avaliação *in vivo* (Crescimento, esporulação e viabilidade) e *in vitro* (Bioensaio em adultos de *D. citri*) Avaliação *in vivo* (Crescimento, esporulação e viabilidade) e *in vitro* (Bioensaio em adultos de *D. citri*)

	Crescimento Vegetativo ¹ ± EP	Esporulação ² ± EP	Viabilidade (%)		Patogenicidade	
			DR ± EP	50 % DR ± EP	Mortalidade ³ ± DP	Esporulação ⁴ ± DP
Acaricida						
Testemunha	1,1 ±0,01 a	1,0±0,05E+08 a	97,7 ±1,2 a	97,6 ±1,6 a	16,9 ±4,6 d	0
Envidor	0,9 ±0,01 b	0,041±0,003E+08 b	97,4 ±1,1 a	98,6 ±0,7 a	42,3 ± 4,3 b	11,3 ± 3,3 b
Omite 500 WP	0,7 ±0,01 c	0,0002 ±0,00004E+08 c	96,6 ±1,3 a	98,9 ±0,4 a	57,6 ± 11,2 a	18,3 ± 4,26 a
Enxofre fersol 520 SC	0,9 ±0,01 a	0,003±0,0003E+08 c	83,7 ±3,1 b	88,7 ±2,8 b	33,4 ± 8,2 c	9,67 ± 2,12 c
Espalhante						
Testemunha	1,1 ±0,01 a	1,0±005E+08 a	97,6 ±1,2 a	97,6 ±1,6 a	16,9 ±4,6 c	0
Cerium plus	1,1 ±0,003 a	1,3±003E+08 a	97,6 ±1,4 a	97,8 ±2,1 a	49,2 ± 3,3 a	31,6 ± 4,9 a
QualyAplic TopSpray	0,8 ±0,01 b	2,41±0,02E+08 a	98 ±1,3 a	98,2 ±1,4 a	40,5 ± 6,5 b	28,3 ± 5,2 a
Fertilizante folhar						
Testemunha	1,1 ±001 a	1,0±0,05E+08 b	97,6 ±1,2 a	97,6 ±1,6 a	16,9 ±4,6 e	0
Triunfo 515	1,1 ±0,01 a	1,90±0,02E+08 a	92,4 ±1,2 b	92,4 ±1,6 b	70 ± 10,2 b	14,7 ± 2,12 b
Triunfo flex	1,2 ±0,005 a	1,91±0,01E+08 a	98,9 ±1 a	99,2 ±0,4 a	61,2 ± 9,9 c	21,9 ± 2,1 a
Triunfo neutrum	1,1 ±0,01 a	1,07± 0,02E+08 b	96,9 ±1,5 a	96,8 ±2,1 a	79,5 ± 7,2 a	24,6 ± 5,4 a
Profol citrus máster	1,1 ±0,003 a	1,25± 0,03E+08 ab	98,1 ±1,2 a	97,9 ±1,4 a	51,5 ± 6,5 d	16,9 ± 3,5 b
Fungicidas						
Testemunha	1,1 ±0,01 a	1,0±0,05E+08 b	97,7 ±1,2 a	97,6 ±1,6 a	16,9 ±4,6 b	0
Kentan 40 WG	1,3 ±0,01 a	1,08±0,04E+08 b	7,03 ±3,6 c	11,4 ±5,1 b	28,4 ± 9,2 a	5,4 ± 1,8 b
Comet	1,0 ±001 a	1,1±0,043E+08 b	95,1 ±3,1 b	96,7 ±2,2 a	30,5 ± 8,1 a	9,8 ± 3,2 a
Flint 500 WG	0,7 ±0,04 b	2,8±0,04E+08 a	0	0	16,5 ± 4 b	0
Nativo	0	0,00E+00	0	0	17 ± 1 b	0
Carbendazim	0	0,00E+00	0	0	11,4 ± 4,5 c	0
Inseticida biológico						
Testemunha	1,1 ±0,01 a	1,0E±0,05+08 b	97,7 ±1,2 a	95,6 ±1,6 a	16,9 ±4,6 b	0
Dipel	1,2 ±0,01 a	1,6±0,1E+08 a	91,3 ±2,3 b	94,7 ±4,1 a	79,3 ± 12 a	37,3 ±7,2
Fungicida bactericida						
Testemunha	1,1 ±0,01 a	1,0±0,05E+08 a	97,7 ±1,2 a	95,6 ±1,6 a	16,9 ±4,6 b	0
Cupuran 500 PM	0,5 ±0,004 b	0,05E±0,003+08 b	99,3 ±0,3a	99,2 ±0,6 a	92,8 ± 1,3 a	47,4 ±5,49
Inseticida/acaricida						
Testemunha	1,1 ±0,01 a	1,0±0,05E+08 c	97,7 ±1,2 a	97,6 ±1,6 a	16,9 ±4,6 e	0
Nufos 480 CE	0,5 ±0,01 b	0,003±0,0002E+08 f	96,4 ±0,3 a	97,9 ±1,2 a	89,3 ± 3,2 a	19,5 ± 6,8 c
Abamectin nortox	1,1 ±0,01 a	0,13 ±0,03E+08 d	97,5 ±0,6 a	97,9 ±0,2 a	74,6 ± 3,7 d	21,8 ± 4 c
Danimen 300 CE	0,9 ±0,01 a	0,02±0,001E+08 e	78,2 ±1,8 b	82,3 ±3,1 b	78,6 ± 2,4 c	34,5 ± 6,6 a
Dimetoato CE	1 ±0,01 a	3,3±0,2E+08 a	68,4 ±4,3b	83,9 ±1,4 b	81,6 ±4,5 b	26,5 ± 4,9 b
Kraft 36 CE	1,1 ±0,01 a	3,1±0,2E+08 a	97,1 ±0,4 a	98,2 ±0,6 a	92,9 ±2,12 a	18,6 ± 4,3 c
Dimexion	0,9 ±0,004 a	1,8E±0,04+08 b	98,4 ±1,2 a	100 a	81,3 ± 4,5 b	17,2 ± 3,2 d
Inseticida						
Testemunha	1,1 ±0,01 a	1,0±0,05E+08 a	97,7 ±1,2 a	97,6 ±1,6 a	16,9 ±4,6 c	0
Karate zeon 50 CS	1 ±0,003 a	0,62±0,06E+08 b	98,9 ±0,4 a	99,2 ±0,1 a	76,8 ± 3,7 b	17,9 ± 4,3 b
Tiger 100 CE	0,9 ±0,02 a	1,3 ±0,09E+08 a	91,2 ±1,1 b	98,2 ±0,4 a	81,4 ± 3,3 a	15,8 ± 3,9 b
Decis ultra 100 CE	0,4 ±0,01 b	0,04±0,0002E+08 d	97,8 ±0,2 a	96,9 ±0,4 a	80,3 ± 6,6 a	20,1 ± 3,8 a
Provado 200 CS	1,1 ±0,02 a	0,2±0,03E+08 c	96,8 ±0,5 a	96,9 ±0,5 a	77,4 ± 5,4 b	23,2 ± 4,5 a
Inseticida/fungicida /bactericida						
Testemunha	1,1 ±0,01 a	1,0±0,05E+08 a	97,7 ±1,2 a	97,6 ±1,6 a	16,9 ± 4,6 b	0
Iharol	0,9 ±0,003 b	0,03±0,003E+08 b	95,8 ±1,2 a	94,7 ±0,5 a	86,7 ± 2,1 a	29,8 ± 6,1

¹ Crescimento vegetativo da colônia (Cm), ² Esporulação da colônia (milhões de esporos), ³ Mortalidade de adultos de *D. citri* (%), ⁴ Esporulação nos cadáveres de adultos de *D. citri* (%). Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05). Análise estatística realizada dentro grupo de produtos químicos

Tabela 7 - Compatibilidade toxicológica dos agroquímicos com o fungo *B. bassiana* ESALQ-PL63 por três métodos

	IB ¹	CT ²	± DP ³
Acaricida			
Envidor	66 (MT)	67 (MT)	63,8-83,2 (C)
Omite 500 WP	249 (C)	145 (C)	63,1-76,5 (MT)
Enxofre fersol 520 SC	30 (T)	39 (T)	46,8-56,2 (MT)
Espalhante			
Cerium plus	117 (C)	96 (C)	71,4-85,6 (C)
QualyAplic TopSpray	141 (C)	98 (C)	55,6-64,2 (MT)
Fertilizante folhar			
Triunfo 515	102 (C)	89 (C)	85,9-90,7 (C)
Triunfo flex	168 (C)	114 (C)	69,3-83,7 (C)
Triunfo neutrum	108 (C)	91 (C)	81,8-88,4 (C)
Profol citrus máster	83 (C)	73 (MT)	62,1-76,9 (C)
Fungicidas			
Kentan 40 WG	43 (MT)	45 (T)	29,8-37,6 (MT)
Comet	63 (MT)	43 (T)	17,5-22,7 (T)
Flint 500 WG	22 (T)	10 (T)	6,3-10,5 (T)
Nativo	0 (T)	4 (T)	9,4-13,2 (T)
Carbendazim	0 (T)	3 (T)	6,69-11,5 (T)
Inseticida biológico			
Dipel	60 (MT)	73 (MT)	81,7-94,9 (C)
Fungicida bactericida			
Cupuran 500 PM	16 (T)	57 (MT)	71,5-92,5 (C)
Inseticida/acaricida			
Nufos 480 CE	23 (T)	58 (MT)	88-93,4 (C)
Abamectin nortox	138 (C)	101 (C)	74,4-85,2 (C)
Danimen 300 CE	68 (C)	75 (MT)	78,8-90,6 (C)
Dimetoato CE	40 (T)	60 (MT)	75,5-82,5 (C)
Kraft 36 CE	198 (C)	130 (C)	84,1-93,1 (C)
Dimexion	118 (C)	93 (C)	77,3-89,7 (C)
Inseticida			
Karate zeon 50 CS	67 (C)	74 (MT)	82,9-93,9 (C)
Tiger 100 CE	129 (C)	97 (C)	78,9-88,7 (C)
Decis ultra 100 CE	74 (C)	65 (MT)	74,9-85,1 (C)
Provado 200 CS	179 (C)	114 (C)	69,7-83,3 (C)
Inseticida/fungicida/bactericida			
Iharol	220 (C)	144 (C)	92,2-96,4 (C)

¹IB = 47 (CV) + 43 (ESP) + 10 (GER)/100, sendo IB = índice biológico; CV = crescimento vegetativo da colônia; ESP = esporulação da colônia; GER = germinação dos conídios. Os valores obtidos de IB foram comparados com os limites descritos pelo autor (0 a 41 = tóxico, 42 – 66 = moderadamente compatível e > 66 compatível). ²CT = [15 (CV) + 18 (ESP) + 20 (GER) + 36 (MORT) + 11 (ESP-CAD)]/100, sendo CT = Classificação toxicológica, CV = crescimento vegetativo da colônia em cm; ESP = número de conídios por colônia; GER = porcentagem de germinação dos conídios; MORT = porcentagem de mortalidade dos insetos; ESP-CAD = porcentagem de cadáveres esporulados pelo fungo. Os valores obtidos de CT foram comparados com os limites obtidos pela técnica de Jackknife (0-49 = tóxico, 50–75 = moderadamente compatíveis e > 75 compatível). ³M±DP = Classificação toxicológica pela comparação da mortalidade dos insetos pulverizados com as misturas de fungo com os agroquímicos em comparação a mortalidade causada só pelo fungo e mortalidade da testemunha

Tabela 8 - Compatibilidade toxicológica dos agroquímicos com o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 por três métodos

	IB ¹	CT ²	M ± DP ³
Acaricida			
Envidor	49 (MT)	49 (T)	38-46,6 (MT)
Omite 500 WP	38 (T)	52 (MT)	46,4-67,8 (C)
Enxofre fersol 520 SC	49 (MT)	43 (T)	25,2-41,6 (MT)
Espalhante			
Cerium plus	110 (C)	79 (C)	41,9-56,5 (MT)
QualyAplic TopSpray	146 (C)	88 (C)	34-47 (MT)
Fertilizante folhar			
Testemunha			
Triunfo 515	134 (C)	93 (C)	59,8-80,2 (C)
Triunfo flex	139 (C)	94 (C)	51,3-71,1 (C)
Triunfo neutrum	100 (C)	84 (C)	72,3-86,7 (C)
Profol citrus máster	109 (C)	77 (C)	48-58 (MT)
Fungicidas			
Kentan 40 WG	101 (C)	49 (T)	19,2-37,6 (T)
Comet	100 (C)	65 (MT)	22,4-38,6 (T)
Flint 500 WG	146 (C)	64 (MT)	12,5-20,4 (T)
Nativo	0 (T)	6 (T)	1-3 (T)
Carbendazim	0 (T)	4 (T)	6,9-15,9 (T)
Inseticida biológico			
Dipel	126 (C)	95 (C)	67,3-91,3 (C)
Fungicida bactericida			
Cupuran 500 PM	32 (T)	66 (MT)	91,5-94,1 (C)
Inseticida/acaricida			
Nufos 480 CE	30 (T)	60 (MT)	86,1-92,5 (C)
Abamectin nortox	61 (MT)	66 (MT)	70,9-78,3 (C)
Danimen 300 CE	46 (MT)	60 (MT)	76,2-80,9 (C)
Dimetoato CE	187 (C)	118 (C)	77,1-86,1 (C)
Kraft 36 CE	185 (C)	124 (C)	90,8-95 (C)
Dimexion	121 (C)	94 (C)	76,8-85,8 (C)
Inseticida			
Karate zeon 50 CS	78 (C)	74 (MT)	73,1-80,5 (C)
Tiger 100 CE	102 (C)	85 (C)	78,1-84,7 (C)
Decis ultra 100 CE	27 (T)	57 (MT)	73,7-86,9 (C)
Provado 200 CS	65 (MT)	69 (MT)	72-82,8 (C)
Inseticida/fungicida/bactericida			
Iharol	60 (MT)	72 (MT)	84,6-88,8 (C)

¹IB = 47 (CV) + 43 (ESP) + 10 (GER)/100, sendo IB = índice biológico; CV = crescimento vegetativo da colônia; ESP = esporulação da colônia; GER = germinação dos conídios. Os valores obtidos de IB foram comparados com os limites descritos pelo autor (0 a 41 = tóxico, 42 – 66 = moderadamente compatível e > 66 compatível). ²CT = [15 (CV) + 18 (ESP) + 20 (GER) + 36 (MORT) + 11 (ESP-CAD)]/100, sendo CT = Classificação toxicológica, CV = crescimento vegetativo da colônia em cm; ESP = número de conídios por colônia; GER = porcentagem de germinação dos conídios; MORT = porcentagem de mortalidade dos insetos; ESP-CAD = porcentagem de cadáveres esporulados pelo fungo. Os valores obtidos de CT foram comparados com os limites obtidos pela técnica de Jackknife (0-49 = tóxico, 50–75 = moderadamente compatíveis e > 75 compatível). ³M±DP = Classificação toxicológica pela comparação da mortalidade dos insetos pulverizados com as misturas de fungo com os agroquímicos em comparação a mortalidade causada só pelo fungo e mortalidade da testemunha

Na classificação toxicológica dos agroquímicos com os fungos *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, utilizaram-se três métodos diferentes, sendo o primeiro método o modelo matemático descrito por Rossi-Zalaf et al. (2008) para a obtenção do índice biológico $[IB = 47 (CV) + 43 (ESP) + 10 (GER)/100]$, utilizando a porcentagem do crescimento vegetativo da colônia; porcentagem de esporulação da colônia e porcentagem da germinação dos conídios (em relação ao controle). O segundo método desenvolvido a partir dos resultados gerados neste trabalho, obteve a expressão matemática $CT = [15 (CV) + 18 (ESP) + 20 (GER) + 36 (MORT) + 11 (ESP-CAD)]/100$ que permitiu utilizar as mesmas variáveis inseridas no primeiro modelo, além da mortalidade dos adultos de *D. citri* e a esporulação dos cadáveres após serem pulverizados em conjunto com cada um dos agroquímicos. Na comparação dos dois modelos observa-se que em 18 produtos (66,7%) para *B. bassiana* e 17 (63%) para *I. fumosorosea* as classificação toxicológica atribuída foi a mesma pelos dois métodos. Para os produtos onde houve discordância entre as categorias atribuídas pelos dois métodos, em seis deles a classificação pelo CT é mais tóxica e em 3 produtos menos tóxica do que a classificação pelo IB considerando o fungo *B. bassiana*. Já para *I. fumosorosea*, em 6 produtos a classificação pelo CT é mais tóxica e em 4 produtos menos tóxica do que a classificação pelo IB.

Uma terceira análise foi realizada, criando-se uma classificação toxicológica baseada exclusivamente nos resultados de mortalidade dos insetos pulverizados com as misturas de fungo com os agroquímicos. Foram considerados compatíveis os produtos cujas misturas com o fungo tenham causado mortalidades semelhantes a aplicação do fungo isoladamente. Foram considerados produtos incompatíveis aqueles cujas misturas com o fungo tenha resultado em mortalidades iguais a aplicação de água com o adjuvante. Os produtos que não se enquadraram nestas categorias foram considerados moderadamente compatíveis. Considerou-se mortalidade semelhante tratamentos cujos valores de mortalidade mais ou menos os desvios padrão das médias se sobrepueram.

Baseado nesta análise, um maior número de produtos foi considerado compatível com os fungos. O número de produtos compatíveis por este método foi de 19 (70%) para *B. bassiana*, e 17 (63%) para *I. fumosorosea*, enquanto pelo IB e CT foi de 15 e 11 produtos para os dois fungos. Apenas 10 agroquímicos (37%) apresentaram a mesma classificação toxicológica nos três métodos usados e todos estes para produtos compatíveis e tóxicos e nenhum para produtos moderadamente tóxicos.

Os resultados acima revelam que cada produto apresenta efeitos que podem ser negativos ou positivos nos parâmetros da biologia dos fungos. Um determinado produto pode afetar o

crescimento, mas não afetar a esporulação, por exemplo, ou vice versa. A grande maioria dos produtos, exceto os fungicidas, não afetam de forma drástica a germinação dos conídios. A melhor forma de sintetizar todos os resultados de testes de toxicidade em categorias de compatibilidade ainda não está bem definida. A primeira discussão importante é se os testes de toxicidade objetivam entender a compatibilidade ambiental do produto sobre as populações nativas ou aplicadas de forma inundativa de fungos entomopatogênicos em campo ou se o objetivo do estudo é determinar a compatibilidade dos produtos para mistura em calda de aplicação. No caso de *D. citri*, as duas abordagens são importantes. O uso de produtos seletivos poderão conservar as populações de fungos entomopatogênicos no ambiente e estes contribuirão para a regulação das populações de pragas. Neste caso, o uso da análise IB e CT podem expressar o potencial de impacto que as aplicações dos produtos possa ter nas populações de fungos no ambiente. Entretanto, os fungos entomopatogênicos a serem aplicados em campo como substitutivo aos inseticidas químicos para o controle de *D. citri*, em muitas aplicações (ou na maioria das aplicações em muitas propriedades) deverão ser incorporados ao tanque de pulverização com vários outros agroquímicos, para reduzir o custo de mecanização. Desta forma, a maior preocupação com *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, refere-se a compatibilidade dos produtos para mistura em calda de aplicação. Neste sentido, entendemos que os resultados dos bioensaios de patogenicidade (*in vivo*) são os mais elucidativos, especialmente o parâmetro mortalidade. Comparando-se a mortalidade obtida pela aplicação dos agroquímicos com os fungos em relação a mortalidade somente dos fungos e somente de alguns agroquímicos, observa-se que 19 produtos são compatíveis, 4 são moderadamente tóxicos e 4 (todos fungicidas) são tóxicos para *B. bassiana* e 17 produtos são compatíveis, 5 são moderadamente tóxicos e 5 (todos fungicidas) são tóxicos para *I. fumosorosea*. Apenas cinco produtos apresentaram categorias de compatibilidade diferentes entre os dois fungos, sendo que as diferenças para Omite e Kentan foram pequenas entre os resultados de mortalidade dos dois fungos e para os outros três produtos, Envidor, Cerium e Profol o efeito na redução da mortalidade dos insetos foram maiores para *I. fumosorosea* do que para *B. bassiana*.

Figura 19 - Efeito dos agroquímicos na mortalidade de *D. citri* e esporulação dos fungos nos cadáveres. **T1.** Iharol (Inseticida/fungicida/acaricida) + 0,075% do KBRAdj), **T2.** Iharol, **T3.** *B. bassiana* 5×10^6 conídios/mL + 0,075% do KBRAdj + Iharol, **T4.** Triunfo 515 (Fertilizante foliar) + 0,075% do KBRAdj), **T5.** Triunfo 515, **T6.** *B. bassiana* 5×10^6 conídios/mL + 0,075% do KBRAdj + Triunfo 515, **T7.** Envirdor (Acaricida) + 0,075% do KBRAdj, **T8.** Envirdor, **T9.** *B. bassiana* 5×10^6 conídios/mL + 0,075% do KBRAdj + Envirdor, **T10.** Nufos Inseticida/acaricida) + 0,075% do KBRAdj, **T11.** Nufos, **T12.** *B. bassiana* 5×10^6 conídios/mL + 0,075% do KBRAdj + Nufos, **T13.** Karate (Inseticida) + 0,075% do KBRAdj, **T14.** Karate, **T15.** *B. bassiana* 5×10^6 conídios/mL + 0,075% do KBRAdj + Karate, **T16.** *B. bassiana* 5×10^6 conídios/mL + 0,075% do KBRAdj, **T17.** 0,075% do KBRAdj, **T18.** Controle, **T19.** *I. fumosorosea* 5×10^6 conídios/mL

Finalmente, as aplicações de um representante de cada categoria de agroquímico isoladamente, ou com 0,075% KBRAdj, ou com o fungo *B. bassiana* ESALQ-PL63 a 5×10^6 conídios/mL + 0,075% KBRAdj (Figura 19), revelou que quase a totalidade das mortalidades observadas foram devido a ação do fungo e não do agroquímico. A comparação de cada agroquímico isoladamente, ou com 0,075% KBRAdj revelaram que exceto para Iharol e Triunfo 515 o adjuvante não contribui para a mortalidade e não ha efeito sinérgico do adjuvante com o agroquímico testado. Embora a mortalidade total quando o fungo foi aplicado isoladamente e em associação com os agroquímicos tenham sido semelhantes, a porcentagem de cadáveres esporulados com o fungo foi reduzida na presença dos agroquímicos. Como parâmetro de comparação entre os fungos, foi aplicado o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 a 5×10^6 conídios/mL não apresentando diferenças significativas para a mortalidade e para a esporulação quando comparado com *B. bassiana*.

3 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Exceto Tween 80 a 0,001%, todos os adjuvantes (KBRAdj, Break thru, Agral, Cerium plus e Silwet) contribuíram para aumentar a eficácia de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* no controle de *D. citri*.

Aplicações dos fungos a 5×10^6 conídios/mL com 0,025% Silwet L-77 resultaram em mortalidades superiores a 78,7% em semi-campo.

Resultados consistentes foram observados em laboratório, semi-campo e campo com aplicações dos dois fungos a 5×10^6 conídios/mL com 0,075% KBRAdj.

Os valores mais elevados do número de insetos esporulados foram observados no período chuvoso, de novembro a março e os valores mais baixos observados no período seco, de maio a setembro. Não se espera na época seca uma ciclagem do fungo no ambiente o que deve acontecer no período das chuvas onde os cadáveres esporulados irão gerar novos ciclos de infecção.

As pequenas diferença de eficiência de controle entre as pulverizações a 1000 L/ha e 2000 L/ha sugere que aplicações no menor volume sejam mais vantajosas economicamente.

Exceto os fungicidas, a grande maioria dos produtos são compatíveis com os fungos e podem ser misturados na calda de aplicação.

Nas aplicações dos agroquímicos com os fungos observou-se que quase as totalidades das mortalidades observadas foram devido à ação do fungo e não do agroquímico.

A porcentagem de cadáveres esporulados com o fungo foi reduzida na maioria dos insetos pulverizados com a mistura do fungo com os agroquímicos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, T.L.; SHOKROLLAH, H.; SIJAM, K.; ABDULLAH, S.N.A. Control of huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 17, p. 4007-4015, 2009.
- ALVES, B.A. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- ALVES, S.B.; MOINO Jr., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 217-238.
- AVERY, P.B.; WEKESA, W.V.; HUNTER, W.B.; HALL, D.G.; MCKENZIE, C.; OSBORNE, L.S.; POWELL, C.A.; ROGERS, M.E. Effects of the fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) on reduced feeding and mortality of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 1065-1078, 2011.
- BARTLETT, M.C.; JARONSKI, S.T. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In: BURGE, M.N. (Ed.). **Fungi in biological control systems**. Manchester: Manchester University Press, 1988. p. 61-85.
- BATEMAN, R. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. **Outlook on Agriculture**, Elmsford, v. 26, n. 1, p. 13-18, 1997.
- BATEMAN, R.P.; ALVES, R.T. Delivery systems for mycoinsecticides using oil-formulations. **Aspects Applied Biology**, Welles Bourne, v. 57, p. 163-170, 2000.
- BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidity's. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 122, p. 145-152, 1993.
- BELOTI, V.H.; RUGNO, G.R.; FELIPPE, M.R.; YAMAMOTO, P.T. Incidência de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros em produção e em pomar em formação. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 2007, São Paulo. **Resumos...** v. 69, n. 2, p. 113-198
- BERGMANN, E.C.; FERNANDES, S.C.S.; FARIA, A.M. de. Surto de *Diahorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemíptera: Psyllidae), em pomares cítricos do estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 22-25, 1994.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, p. 7-37, 2006.
- BOYETCHKO, S.; PEDERSEN, E.; PUNJA, Z.; REDDY, M. Formulations of biopesticides. In: HALL, F.R.; MENN, J.J. (Ed.). **Biopesticides: use and delivery**. Totowa: Humana Press, 1999. p. 487-508.

BRADLEY, C.A.; BLACK, W.E.; KEARNS, R.; WOOD, P. Role of production technology in mycoinsecticide development. In: LEATHAM, G.F. (Ed.). **Frontiers in industrial mycology**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 160–173.

BRANDIMARTE, I. **Inseticidas sistêmicos, em diferentes modalidades de aplicação, no controle de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em plantas cítricas em produção**. 2011. 29 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros) - Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2011.

BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D.; VALÉRO, J.R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, London, v. 41, p. 323–342, 2006.

BURGES, H.D. **Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**. Dordrecht: Kluwer, 1998. 412 p.

_____. Techniques for testing microbials for control of arthropod pests in greenhouses. In: LACEY, L.A.; KAYA, H.K. (Ed.). **Manual of techniques in invertebrate pathology**. San Diego Springer Netherlands, 2007. p. 463–479.

BUTT, T.M. Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In: KEMPKEN, F. (Ed.). **The mycota XI: agricultural applications**. Berlin: Springer, 2002. p. 111–134.

CERMELIN, M.; MORALES, P.; GODOY, F. Presencia del psíldeo asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Venezuela. **Boletín de Entomología Venezolana**, Caracas, v. 2, n. 15, p. 235–243, 2000.

CHAPPLE, A.C.; DOWNER, R.A. BATEMAN, R.P. Theory and practice of microbial insecticide application. In: LACEY, L.A.; KAYA, H.K. (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. 2nd ed. Dordrecht: Springer, 2007. p. 9–34.

CITRUSBR. Associação Nacional dos exportadores de sucos cítricos. **Retrato da citricultura**. 2010. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/brasil/retrato-da-citricultura-256277-1.asp>>. Acesso em: 14 jan. 2014.

COLETE-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JR., J.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1382, 2004.

COPPING, L.G. **The manual of biocontrol agents: a world compendium**. 4th ed. Alton: British Crop Production Council, 2009. 336 p.

COSTA LIMA, A.M. **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. v. 3: Homopteros, 327 p.

COUCH, T.L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J.-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 297–316.

COUCH, T.L.; IGNOFFO, C.M. Formulation of insect pathogens. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases, 1970–1980**. London: Academic Press, 1981. p. 621–634.

DAIAN, O.P.G. **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável**. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

DE FARIA, M.R.; WRIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoararicides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, p. 237–256, 2007.

ELSWORTH, J.F.; GROVE, J.F. Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* Bals. Part 1 Beauveroides H and I. **Journal of the Chemical Society**, Peking, v. 3, p. 270–273, 1977.

EVANS, H.C. Biological control of weed and insect pests using fungal pathogens, with particular reference to Sri Lanka. **Biocontrol News and Information**, Berks, v. 20, n. 2, p. 63N–68N, 1999.

FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 22, p. 18–21, set./out. 2001.

FENG, M.G.; POPRAWSKI, T.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science Technology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 3–34, 1994.

FERRON, P.; FARGUES, J.; RIBA, G. Fungi as microbial insecticides against pest. In: ARORA, D.K.; AJELLO, I.; MUKERJI, K.G. (Ed.). **Handbook of applied mycology**. New York: Marcel Dekker, 1991. v. 2. Humans, animals and insects, p. 665–706.

FLEXNER, J.; LIGHTHERT, B.; CROFT, B.A. The effect of microbial pesticides to non-target, beneficial arthropods. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 16, p. 203–254, 1986.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Tomada de decisão em laranjais pede cautela. In: _____. **AGRIANUAL 2013: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2013. p. 249–250.

FUNDECITRUS. 2011. Disponível em: <[http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/Greening-\(HLB\),35](http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/Greening-(HLB),35)>. Acesso em: 04 jan. 2014.

GARAY, L.C. **Manual técnico de identificación a campo del huanglongbing de los cítricos y el insecto vector *Diaphorina citri***. Entre Ríos: INTA, Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas, 2009. 20 p.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, D.G. Fungi: Hyphomycetes. In: LACEY, L.A.; KAYA, H.K. (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. 2nd ed. Dordrecht: Springer, 1997. p. 249–264.

GOETTEL, M.S.; ROBERTS, D.W. Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. In: LOMER, C.J.; PRIOR, C. (Ed.). **Biological control of locusts and grasshoppers**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 230–244.

GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 119-139, 2010.

GRAFTON-CARDWELL, E.E.; STELINSKI, L.L.; STANSKY, P.A. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 58, p. 413-432, 2013.

GUILLON, M. Formulation of biopesticides: an industrial view of biological control agents. In: WORKSHOP IN THE EC PROGRAMME “COMPETITIVENESS OF AGRICULTURE AND MANAGEMENT OF AGRICULTURAL RESOURCES” (CAMAR) ON BIOLOGICAL CONTROL OF FRUIT AND FOLIAR DISEASE, 1993, Gembloux. **Proceedings...** Brussels: EC D.-G. Agriculture, 1993. p. 99-105.

HACKMAN, R.H. Cuticle: biochemistry. In: BEREITER-HAHN, J.; MALTOLTS, A.G.; RICHARDS, K.S. **Biology of the integument**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 626-637.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.

HALBERT, S.E.; NÚÑEZ, C.A. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean Basin. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 87, n. 3, p. 401-402, 2004.

HALL, F.R.; MENN, J.J. **Biopesticides: use and delivery**. Wooster: Ohio State University, 1999. 626 p.

HAMILL, R.L.; SULLIVAN, H.R.; GORMAN, M. Determination of pyrrolnitrin and derivatives by gas-liquid chromatography. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 18, n. 3, p. 310-312, 1969.

HANVRO, A.; ROSEN, D.; ROSSLER, Y.; HILLEL, J. Selection on the male hemizygous genotype in arrhenotokous insects and mites. **Entomophaga**, Paris, v. 32, p. 261-268, 1987.

HIBBET, D.S.; BINDERA, M.; BISCHOFFB, J.F.; BLACKWELL, C.; CANNOND, P.F.; ERIKSSONE, O.E.; HUHNENDORFF, S.; JAMESG, T.; KIRK, D.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H.T.; LUTZONIG, F.; MATHENYA, P.B. MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCHK, C.L.; SPATAFORAK, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIMEM, M.C.; APTROOT, R.B.; DOMINIK, B.; GERALD, L.; BENNY, A.; CASTLEBURY, L.A.; CROUSE, P.W.; DAIR, Y.; GAMSL, W.; GEISERS, D.M.; GRIFFITH, G.W.; GUEIDANG, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKAW, K.; HUMBERT, R.A.; HYDE, K.D.; IRONSIDE, J.E.; KÖLJALGZ, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.; MOZLEY-STANDRIDGE, J.; OBERWINKLER, F.; PARMASTOAH, E.; REEBG., V. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 509–547, 2007.

HOFSTEIN, R.; FRIDLENDER, B. Development of production, formulation and delivery systems. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE, Vol. 3, 1994, Cidade. **Pests and diseases...** Farnham: BCPC Publ., 1994. p. 1273–1280.

HOY, M.; RAGHUWINDER, S.; ROGERS, M. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 93, n. 1, p. 24–32, 2010.

HUMBER, R.A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, p. 262–266, 2008.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford: CAB International, 2001. p. 23–69.

JACKSON, M.A.; DUNLOP, C.A.; JARONSKI, S.T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, p. 129–145, 2010.

JACKSON, M.A.; ERHAN, S.; POPRAWSKI, T.J. Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 61–75, 2006.

JACKSON, M.A.; MCGUIRE, M.R.; LACEY, L.A.; WRAIGHT, S.P. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, n. 1, p. 35–41, 1997.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J.; GARNIER, M.M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 44, p. 379–386, 1994.

JENKINS, N.E.; GOETTEL, M.S. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, Ottawa, v. 171, p. 37–48, 1998.

JONES, K.A.; BURGESS, D. Product stability: from experimental preparation to commercial reality. In: EVANS, H.F. (Ed.). **Microbial insecticides: novelty or necessity?** Farnham: BCPC, 1997. p. 163–171. (BCPC. Symposium Proceedings, 68).

JONES, K.A.; CHERRY, A.J.; GRZYWACZ, D.; BURGESS, D.H. Formulation: is it an exclusive for poor application? In: EVANS, H.F. (Ed.). **Microbial insecticides: novelty or necessity?** Farnham: BCPC, 1997. p. 173–180. (BCPC. Symposium Proceedings, 68).

KOPPERNHÖFER, A.M. Nematodes. In: LACEY, L.A.; KAYA, H.K. (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. 2nd ed. Dordrecht: Springer, 2007. p. 249-264 p.

LACEY, L.A.; KAYA, H.K. (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. 2nd ed. Dordrecht: Springer, 2007. 484 p.

LACEY, L.A.; FRANSEN, J.J.; CARRUTHERS 1996. Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. In: GERLING, D.; MAYER, R. (Ed.). **Bemisia: taxonomy, biology, damage and management**. Hampshire: Intercept Andover Publ., 1996. p. 401-433.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; CHÁVEZ-FLORES, O.; ANGEL-SAHAGÚ, C.A.; SKODA, S.T.; REYES-MARTÍNEZ, G.; BARBA-REYNOSO, M.; DOMÍNGUEZ, O.R.; AGUILAR, G.; FOSTER, J.E. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 32, n. 1, p. 39–44, 2012.

LISANSKY, S.G.; HALL, R.A. Fungal control of insects. In: SMITH, J.E.; BERRY, D. R.; KRISTIANSEN, B. (Ed.). **The filamentous fungi**. London: Edward Arnold, 1983. v. 4: Fungal technology, p. 326-345.

MELLO, C.B.; NIGAM, Y. Studies on a haemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 91, n. 4, p. 289-296, 1999.

MENDONÇA, A.F. Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata*, in Brasil. In: LOMER, C.J.; PRIOR, C. (Ed.). **Biological control of locusts and grasshoppers**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 239–244.

MILNER, R.J.; HUNTER, D.M. Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locusts and grasshoppers in Australia. **Journal Orthoptera Research**, Philadelphia, v. 10, n. 2, p. 271–276, 2001.

NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, p. 709-715, 2007.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F. CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: USP, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, 2010. 70 p.

NEVILLE, A.C. Cuticle: organization. In: BEREITER-HAHN, J.; MATOLTS, G.; RICHARDS, K.S. **Biology of the integument**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 611-625.

POPRAWSKI, T.J.; MAJCHROWICZ, L. Effects of herbicides on in vitro vegetative and sporulation of entomopathogenic fungi. **Crop Protection**, Lincoln, v. 14, n. 1, p. 81-87, 1995.

QURESHI, J.A.; STANSKY, P.A. Dormant season foliar sprays of broad-spectrum insecticides: an effective component of integrated management for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus orchards. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 860-866, 2010.

REGMI, C.; LAMA, T.K. Greening incidence and Greening vector population dynamics in Pokhara. In: CONFERENCE.INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceedings...** Riverside: IOCV Conference, 1988. p. 238-242.

RHODES, D.J. Formulation requirements for biological control agents. **Aspects Applied Biology**, Wellesbourne, v. 24, p. 145-153, 1990.

ROBERTS, D.W. Tixins of entomopathogenic fungi. In: BUSGES, H.D. (Ed.). **Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p. 441-446.

ROSSI-ZALAF, L. S.; ALVES, S.B.; LOPES, R. B.; NETO, S. S.; TANZINI, M.R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 270-302.

St. LEGER, R.J.; BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, W. D. 1989. Production in vitro of appressori by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 13, p. 274-288,

STARNES, M.C.; JOKLIK, W.K. Reovirus protein 13 is a poly (C) dependent poly (G) polymerase. **Virology**, London, v. 193, p. 356-366, 1983.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANNED, J.L.; COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease in São Paulo State, Brazil). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Basingstoke, v. 55, p. 1857-1862, 2005.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p.1721-1725, 2000.

UEHARA-CARMO, A.; RUGNO, G.R.; FELIPPE, M.R.; COELHO, J.H.; XIMENES, N.L.; GARBIN, L.F.; YAMAMOTO, P.T. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e psílídeo (Hemiptera: Psyllidae) em pomar cítrico no município de Taquaritinga/SP. In: HUANGLONGBING GREENING WORKSHOP INTERNATIONAL, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...** p. 101.

WHITTEN, M.J.; OAKESHOTT, J.G. Opportunities for modern biotechnology in control of insect pest and weeds, with special reference to developing countries. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 39, n. 4, p. 155-181, 1991.

WOOLER, A.; PADGHAM, D.; ARAFAT, A. Outbreaks and new records Saudi Arabia. *Diaphorina citri* on citrus. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 22, p. 93-94, 1974.

YAMAMOTO, P.T.; PAIVA, P.E.B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 165-170, 2001.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ANDERSCH, W. Production of fungi as crop protection agents. **Pflanzenschutz-Nachr. Bayer, Leverkusen.** v. 45, n. 1, p. 129–142, 1992

BADFICHSCH, G.A.; HARMAR, S.L. Omega-conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). **Toxicon**, Elmsford, v. 28, n. 11, p. 1249-1254, 1990.

BEDDING, R.A. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. **Nematologica**, Leiden, v. 27, p. 109–114, 1981.

_____. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Annals Applied Biology**, Warwick, v. 104, p. 117–120, 1984.

DENT, D.R. **Removing the barriers to commercialization:** summary of the process and key issues for a mycoinsecticide for locust and grasshopper control. Ascot: CAB International, 1998. 346 p.

IGNOFFO, C.M. Development of a viral insecticide: concept to commercialization. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 33, p. 380–460, 1973.

PADULLA, L.F.L. **Estudos de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psilídio *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae).** 2007. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PADULLA, L.F.L.; ALVES, S.B. Suscetibilidade de ninfas de *Diaphorina citri* a fungo entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, p. 297-302, 2009.

SMITS, P.H. **Nuclear polyhedrosis virus as biological control agent of *Spodoptera exigua*.** 1987. 127 p. Thesis (PhD in Virology) - Laboratory of Virology, University Wageningen, Wageningen, 1987.

WRAIGHT, S.P.; CARRUTHERS, R.I. Production, delivery, and use of mycoinsecticides for control of insect pests on field crops. In: HALL, F.R.; MENN, J.J. (Ed.). **Biopesticides:** use and delivery. Totowa: Humana Press, 1999. p. 233–269.

WRAIGHT, S.P.; JACKSON M.A.; DE KOCK S.L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents:** progress, problems and potential. Wallingford: CAB International, 2001. p. 253–287.